

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Departamento de Ingeniería Química**



**TESIS DOCTORAL**

**Inactivación de esporas mediante  $\text{CO}_2$  a alta presión en  
alimentos y materiales sensibles**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Javier Casas Huertas**

**Directora**

**Lourdes Calvo Garrido**

**Madrid, 2018**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Ingeniería Química



INACTIVACIÓN DE ESPORAS MEDIANTE CO<sub>2</sub> A ALTA  
PRESIÓN EN ALIMENTOS Y MATERIALES SENSIBLES

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Javier Casas Huertas**

Directora:

Lourdes Calvo Garrido







**DRA LOURDES CALVO GARRIDO**, PROFESORA TITULAR, DEL  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado “Inactivación de esporas mediante CO<sub>2</sub> a alta presión en alimentos y materiales sensibles”, constituye la Tesis Doctoral que presenta **D. Javier Casas Huertas** para aspirar al título de Doctor, y ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Complutense de Madrid bajo su dirección.

Y para que así conste, firma el presente certificado en Madrid a 15 de abril de dos mil diecisiete.

Lourdes Calvo Garrido



A mi mujer Analay y mis hijos  
José Antonio y Juan y en especial a mi  
abuelo José Antonio.



Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo.

Albert Einstein



## **Agradecimientos**

Es difícil entender la importancia de los agradecimientos de una tesis doctoral hasta que no se ha terminado. En ese momento te das cuenta de cuánto tienes que agradecer a tanta gente. Intentaré resumir en unas líneas la gratitud que siento a todas las personas que han estado presentes durante esta etapa, haciendo posible que hoy deje de ser un sueño para pasar a ser una realidad.

Este trabajo de Tesis realizado en la Universidad Complutense de Madrid es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron distintas personas opinando, corrigiendo, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

En primer lugar, a mi directora de Tesis, Lourdes Calvo, mi más amplio agradecimiento por haberme confiado este trabajo, por su paciencia, por su valiosa dirección y apoyo para seguir este camino de Tesis y llegar a la conclusión del mismo. Su experiencia y conocimientos han sido mi fuente de motivación y de curiosidad durante estos años.

A mi familia, a mi mujer Analay por su paciencia en estos años, a mis hijos por entender mis ausencias para jugar, por sentarse a mi lado con su “portátil” para trabajar con papá, haciendo que fuese más fácil el esfuerzo. Por su apoyo en los buenos y malos momentos, animándome siempre a continuar. Les doy las gracias por todos los esfuerzos que han hecho, por haberme hecho creer cada día que podía



hacerlo, por toda su ayuda y, principalmente, por hacerme feliz. Por todo eso y mucho más este trabajo también les pertenece.

A mis padres por su apoyo, y los principios que me han inculcado, les agradezco que nunca hayan tenido un no, para continuar con mis estudios sin importar el esfuerzo que les supusiese, a mi hermana por su apoyo incondicional y al resto de la familia por su ayuda directa o indirectamente.

A mis amigos de siempre, Jorge , Edu, Tote, Elena, Juanma, Sandra, David, Mayte, Mamen y Sergio, por ser capaces de hacerme olvidar el estrés y los malos momentos. Gracias por tener siempre un momento para improvisar una cena y hacerme reír y evadirme.

A todos mis compañeros y amigos, los chicos de “arriba”, Igor, Gonzalo, Javi, Vane, Alberto, Susana y Mateo y a mi grupo, Miguel, Cristina y Laura, se merecen muchas y muy buenas palabras, ya que con ellos he compartido laboratorio e incontables horas de trabajo y buenos ratos, lo cual no tiene precio. Por todo el tiempo que me han dado, por las conversaciones científicas de las que tanto provecho he sacado, por el respaldo y la amistad. Gracias.

A las entidades que han financiado los proyectos de los cuales este trabajo forma parte.





# INDICE

RESUMEN.....	I
SUMMARY .....	VII
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. IMPACTO SANITARIO Y ECONÓMICO DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIANA DE ALIMENTOS .....	3
1.2. CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA POR BACTERIAS ESPORULADAS .....	4
1.3. ESTRUCTURA DE LAS ESPORAS.....	7
1.4. LEGISLACIÓN .....	9
1.5. TÉCNICAS DE CONTROL MICROBIOLÓGICO EN ALIMENTOS .....	13
1.6. TÉCNICAS DE CONTROL MICROBIOLÓGICO EN MATERIALES SENSIBLES .....	16
1.7. INACTIVACIÓN DE AGENTES BIOLÓGICOS MEDIANTE CO <sub>2</sub> A ALTA PRESIÓN (COAP).....	19
1.7.1. <i>Inactivación de esporas en medios líquidos</i> .....	21
1.7.2. <i>Impacto del medio en la inactivación de esporas con COAP</i> .....	37
1.7.3. <i>Inactivación de esporas en alimentos sólidos mediante COAP</i> .....	39
1.7.4. <i>Inactivación de esporas en materiales sensibles mediante COAP</i> .....	46
1.7.5. <i>Efecto del tratamiento con COAP en la calidad de los alimentos</i> .....	63
1.7.6. <i>Efecto del tratamiento con COAP en la calidad de los materiales sensibles</i> .....	66
1.8. OBJETIVOS DE LA TESIS .....	77
1.9. REFERENCIAS .....	80
<b>2. DESACTIVACIÓN DE ESPORAS DE ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS EN CREMA DE MANZANA CON CO<sub>2</sub> A ALTA PRESIÓN.....</b>	<b>95</b>
2.1. INTRODUCCIÓN.....	97
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	100
2.2.1. <i>Bacterias</i> .....	100
2.2.2. <i>Medio de cultivo</i> .....	100
2.2.3. <i>Materia Prima</i> .....	101
2.2.4. <i>Generación y concentración de esporas de A. acidoterrestris</i> .....	101
2.2.5. <i>Preparación de la muestra</i> .....	102
2.2.6. <i>Determinación de la contaminación de A. acidoterrestris en la crema de manzana</i> .....	102
2.2.7. <i>Tratamiento con COAP</i> .....	103
2.2.8. <i>Desactivación de A. acidoterrestris en crema de manzana</i> .....	104
2.2.9. <i>Determinación de la viscosidad</i> .....	105
2.2.10. <i>Vitamina C</i> .....	106
2.2.11. <i>Color</i> .....	106
2.2.12. <i>pH</i> .....	106
2.2.13. <i>Reynolds de agitación</i> .....	106
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	107
2.3.1. <i>Efecto de la temperatura</i> .....	107
2.3.2. <i>Efecto de la presión</i> .....	110
2.3.3. <i>Efecto del tiempo de tratamiento</i> .....	111
2.3.4. <i>Efecto del medio</i> .....	112
2.3.5. <i>Efecto de las variables que controlan el contacto del CO<sub>2</sub> con la crema</i> .....	114
2.3.6. <i>Efecto del tratamiento con COAP en la calidad de la crema</i> .....	116

2.3.6.1.	Color.....	116
2.3.6.2.	Vitamina C.....	118
2.3.6.3.	Viscosidad .....	119
2.3.6.4.	pH.....	121
2.4.	CONCLUSIONES.....	122
2.5.	AGRADECIMIENTOS.....	123
2.6.	REFERENCIAS .....	123
<b>3.</b>	<b>INACTIVACIÓN DE ESPORAS DE <i>BACILLUS CEREUS</i> EN SUSPENSIÓN ACUOSA Y EN PIMENTÓN .....</b>	<b>129</b>
3.1.	INTRODUCCIÓN .....	131
3.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	133
3.2.1.	<i>Materiales .....</i>	<i>133</i>
3.2.2.	<i>Análisis microbiano del pimentón .....</i>	<i>134</i>
3.2.3.	<i>Generación y concentración de esporas de B. cereus .....</i>	<i>134</i>
3.2.4.	<i>Determinación del grado de inactivación.....</i>	<i>135</i>
3.2.5.	<i>Determinación del pH.....</i>	<i>135</i>
3.2.6.	<i>Inactivación microbiana mediante COAP.....</i>	<i>135</i>
3.2.7.	<i>Tratamiento térmico de inactivación sin CO<sub>2</sub> .....</i>	<i>138</i>
3.2.8.	<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>138</i>
3.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	138
3.3.1.	<i>Impacto de la temperatura .....</i>	<i>139</i>
3.3.2.	<i>Impacto de la presión de operación.....</i>	<i>142</i>
3.3.3.	<i>Efecto del pH externo.....</i>	<i>144</i>
3.3.4.	<i>Efecto de la composición del medio.....</i>	<i>145</i>
3.3.5.	<i>Impacto del modo de operación y el tiempo de contacto.....</i>	<i>146</i>
3.4.	CONCLUSIONES.....	149
3.5.	AGRADECIMIENTOS.....	150
3.6.	REFERENCIAS .....	150
<b>4.</b>	<b>INACTIVACIÓN MICROBIANA DE PIMENTÓN CON ACEITES ESENCIALES Y SU COMBINACIÓN CON CO<sub>2</sub> A ALTA PRESIÓN .....</b>	<b>157</b>
4.1.	INTRODUCCIÓN .....	159
4.2.	MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	164
4.2.1.	<i>Materiales .....</i>	<i>164</i>
4.2.2.	<i>Análisis microbiano de pimentón.....</i>	<i>164</i>
4.2.3.	<i>Generación y concentración de esporas las esporas naturales del pimentón.....</i>	<i>165</i>
4.2.4.	<i>Pruebas de difusión en disco de agar para seleccionar el EO más eficaz.....</i>	<i>165</i>
4.2.5.	<i>Ajuste de la humedad .....</i>	<i>166</i>
4.2.6.	<i>Determinación de la contaminación.....</i>	<i>166</i>
4.2.7.	<i>Método para la inactivación de la carga biológica de pimentón con EO orégano.....</i>	<i>166</i>
4.2.8.	<i>Equipo de alta presión de dióxido de carbono .....</i>	<i>167</i>
4.2.9.	<i>Método para la inactivación de la carga biológica de pimentón usando COAP y OEO .....</i>	<i>167</i>
4.2.10.	<i>El análisis sensorial .....</i>	<i>168</i>
4.2.11.	<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>169</i>
4.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	170
4.3.1.	<i>Selección de la EO más eficaz .....</i>	<i>170</i>

4.3.2. Método para la inactivación de la carga biológica de pimentón con AEO.....	172
4.3.3. La inactivación a través de tratamiento combinado COAP + OEO....	174
4.3.4. Evaluación Sensorial.....	179
4.4. CONCLUSIONES.....	180
4.5. AGRADECIMIENTOS.....	182
4.6. REFERENCIAS.....	182
<b>5. DESTRUCCIÓN DE ARMAS BIOLÓGICAS EN MATERIAL SENSIBLE MEDIANTE CO<sub>2</sub> A ALTA PRESIÓN.....</b>	<b>193</b>
5.1. INTRODUCCIÓN.....	195
5.2. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	200
5.2.1. Microorganismo.....	200
5.2.2. Medio de cultivo.....	200
5.2.3. Aditivos.....	201
5.2.4. Generación y concentración de esporas de <i>B. thuringiensis</i> .....	201
5.2.5. Contaminación de los materiales de equipamiento NBQ.....	202
5.2.6. Determinación de la contaminación de <i>B. thuringiensis</i> en los tejidos del traje NBQ y el material electrónico antes y después del tratamiento con CO <sub>2</sub> SC.....	202
5.2.7. Equipo de tratamiento con CO <sub>2</sub> SC.....	203
5.2.8. Tratamiento de las muestras con CO <sub>2</sub> SC para la desactivación de <i>B. thuringiensis</i> .....	205
5.2.9. Tratamientos térmicos.....	206
5.2.10. Medida de pH.....	206
5.2.11. Determinación de las propiedades de los materiales textiles tratados con COAP.....	207
5.2.12. Análisis estadístico.....	207
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	208
5.3.1. Desactivación de <i>B. thuringiensis</i> en suspensión acuosa.....	209
5.3.1.1. Efecto de la temperatura.....	209
5.3.1.2. Efecto de la presión.....	210
5.3.1.3. Efecto del pH.....	211
5.3.1.4. Efecto del tiempo de operación.....	213
5.3.1.5. Efecto de la actividad de agua, aw.....	214
5.3.2. Desactivación de <i>B. thuringiensis</i> en tejidos de traje NBQ.....	216
5.3.2.1. Optimización de la cantidad de agua.....	216
5.3.2.2. Efecto de la adición de agua solubilizada en el CO <sub>2</sub> .....	217
5.3.2.3. Tratamiento con CO <sub>2</sub> saturado en agua acidificada.....	221
5.3.2.4. Tratamiento con CO <sub>2</sub> saturado en agua modificada con otros aditivos.....	225
5.3.3. Análisis de calidad de los materiales tratados.....	230
5.3.3.1. Calidad de los trajes NBQ tratados en seco y en húmedo.....	230
5.3.3.2. Calidad del material electrónico tratado.....	233
5.4. CONCLUSIONES.....	235
5.5. AGRADECIMIENTOS.....	237
5.6. REFERENCIAS.....	237
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>247</b>
<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>257</b>
INFORMACIÓN PERSONAL.....	259
RESULTADOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DE ESTA TESIS.....	260
OTROS RESULTADOS CIENTÍFICOS.....	261



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> Limites microbiologicos permitidos en alimentos. ....	11
<b>Tabla 1.2.</b> Condiciones y grado de esterilización alcanzado en la esterilización de distintos tipos de esporas mediante COAP en medios líquidos .....	23
<b>Tabla 1.3.</b> Grado de inactivación de la microbiota natural en varios alimentos sólidos mediante el uso de COAP en distintas condiciones y .....	40
<b>Tabla 1.4.</b> Grado de inactivación de esporas bioindicadoras obtenido mediante tratamiento con COAP y distintos aditivos cuando contaminaban.....	47
<b>Tabla 1.5.</b> Atributos de calidad de los alimentos en los que se ha ensayado el uso de COAP para la inactivación de esporas.....	65
<b>Tabla 1.6.</b> Propiedades físico-químicas y mecánicas de biomateriales y otros productos sensibles en los que se ha ensayado el uso de COAP .....	68
<b>Tabla 2.1.</b> Efecto del tiempo de tratamiento en la desactivación de <i>A. acidoterrestris</i> mediante el uso de COAP y mediante calor. ....	111
<b>Tabla 2.2.</b> Resumen de las condiciones, forma de operación y grado de desactivación conseguido en el tratamiento con COAP de <i>A. acidoterrestris</i> en distintos medios. ....	112
<b>Tabla 2.3.</b> Influencia de las variables relacionadas con la eficacia del contacto entre el CO <sub>2</sub> y la crema de manzana, en la desactivación de esporas de <i>A. acidoterrestris</i> .....	115
<b>Tabla 2.4.</b> Variables de calidad de la crema de manzana después del tratamiento con CO <sub>2</sub> y del tratamiento térmico .....	119
<b>Tabla 3.1.</b> Impacto de pH del medio sobre la inactivación de esporas de <i>B. cereus</i> en solución acuosa bajo diferentes tratamientos durante 60 min. ....	144
<b>Tabla 3.2.</b> Impacto del modo de operación, el tiempo de contacto y la turbulencia en la inactivación de esporas de <i>B. cereus</i> por COAP a 300 bar y 70°C.....	148
<b>Tabla 4.1.</b> Actividad antimicrobiana de AEO en contra de la carga biológica de pimentón a diferentes concentraciones y tiempos de contacto.....	173
<b>Tabla 4.2.</b> Resumen de la evaluación del olor de pimentón tratados con COAP y AEO a altas concentraciones. ....	180
<b>Tabla 5.1.</b> Agentes biológicos que más posibilidades tienen de ser utilizados como armas y la dosis mínima en que habría que dispersarlos en aerosoles. ....	196
<b>Tabla 5.2.</b> Resumen de la investigación realizada en la eliminación de virus mediante COAP.....	199
<b>Tabla 5.3.</b> Efecto del pH extracelular en la desactivación de <i>B. thuringiensis</i> .....	212
<b>Tabla 5.4.</b> Desactivación de <i>B. thuringiensis</i> en tejido exterior de traje NBQ a distintos porcentajes de humedad. ....	217
<b>Tabla 5.5.</b> Desactivación de <i>B. thuringiensis</i> en materiales NBQ con COAP y agua.....	219
<b>Tabla 5.6.</b> Desactivación de <i>B. thuringiensis</i> en materiales NBQ con COAP a distintos tiempos de tratamiento. ....	220
<b>Tabla 5.7.</b> Impacto de la adición de agua acidificada con ácido cítrico al CO <sub>2</sub> en la desactivación de esporas de <i>B. thuringiensis</i> en tejido exterior NBQ en diferentes condiciones de operación.....	221
<b>Tabla 5.8.</b> Impacto de la adición de agua acidificada con ácido cítrico al CO <sub>2</sub> en la desactivación de esporas de <i>B. thuringiensis</i> que contaminaban una memoria USB a diferentes pH y decrecientes temperaturas. ....	223



<b>Tabla 5.9.</b> Impacto de la adición de agua acidificada con ácido peracético al CO <sub>2</sub> en la desactivación de esporas de <i>B. thuringiensis</i> que contaminaban una memoria USB a diferentes pH y decrecientes temperaturas.....	224
<b>Tabla 5.10.</b> Impacto de la adición de agua modificada con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10% en fracción en masa de agua) al CO <sub>2</sub> , en la desactivación de esporas de <i>B. thuringiensis</i> que contaminaban una memoria USB.....	227
<b>Tabla 5.11.</b> Impacto de la adición de agua modificada con IPA, al CO <sub>2</sub> en la desactivación de esporas de <i>B. thuringiensis</i> que contaminaban una memoria USB.....	229
<b>Tabla 5.12.</b> Efecto del tratamiento con COAP en seco y en húmedo sobre diversos materiales textiles y poliméricos del atuendo militar. ....	231





## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Esquema de la estructura de una espora latente.....	8
<b>Figura 1.2.</b> Esquema de cómo el CO <sub>2</sub> podría ejercer su acción letal en bacterias vegetativas. ....	21
<b>Figura 2.1.</b> Esquema del equipo de tratamiento con COAP.....	104
<b>Figura 2.3.</b> Comportamiento reológico de la crema de manzana antes y después del tratamiento con CO <sub>2</sub> .....	120
<b>Figura 3.1.</b> Equipo de tratamiento con COAP en operación en continuo. ....	137
<b>Figura 3.2.</b> Comparación entre el tratamiento térmico y con COAP a 300 bar en la inactivación de esporas de <i>B. cereus</i> en agua estéril y en pimentón .....	141
<b>Figura 3.3.</b> Inactivación de esporas de <i>B. cereus</i> suspendidas en agua mediante COAP a crecientes valores de presión operando a dos temperaturas distintas 70 °C y 85°C .....	142
<b>Figura 3.4.</b> Influencia de la grasa en la inactivación de la biocarga natural del pimentón y en esporas de <i>B. cereus</i> tratados por COAP a 60 bar, 80 °C y 45 min de tiempo de contacto.....	146
<b>Figura 4.1.</b> Instalación de tratamiento con COAP mezclado con AEO. ....	168
<b>Figura 4.2.</b> Halo de inhibición del crecimiento de las esporas aisladas de pimentón, con aceite esencial de orégano, orégano + clavo 1: 1 y clavo.....	171
<b>Figura 4.3.</b> Radio de inhibición del crecimiento de las esporas aisladas del pimentón según el tipo de aceite esencial empleado a diferentes concentraciones .....	172
<b>Figura 4.4.</b> Comparación de diferentes tratamientos sobre la inactivación microbiana de pimentón a diferentes niveles de humedad.....	178
<b>Figura 5.1.</b> Esquema del equipo de tratamiento con COAP modificado con un presaturador de agua.....	204
<b>Figura 5.2.</b> Imagen de la instalación utilizada para la esterilización con COAP de tejidos NBQ y material sensible militar. ....	204
<b>Figura 5.3.</b> Desactivación de <i>B. thuringiensis</i> con CO <sub>2</sub> SC aplicado a distintas presiones y temperaturas y comparación con tratamiento térmico. ....	211
<b>Figura 5.4.</b> Desactivación de <i>B. thuringiensis</i> con COAP aplicado a distintos tiempos de tratamiento. ....	213
<b>Figura 5.5.</b> Desactivación de <i>B. thuringiensis</i> en harina de maíz con distintas $a_w$ mediante COAP.....	215
<b>Figura 5.6.</b> Muestra de guante tratado con CO <sub>2</sub> deformado que luego recuperó su tamaño original.....	232
<b>Figura 5.7.</b> Muestra de guante tratada con CO <sub>2</sub> con burbujas causada por el atrapamiento de este gas. ....	232
<b>Figura 5.8.</b> a) Radio tratada con CO <sub>2</sub> a 350 bar, 70°C y 60 min; b) móvil tratado con COAP saturado en agua a 350 bar, 70°C y 30 min; c) el mismo móvil encendido después del tratamiento. ....	234
<b>Figura 5.9.</b> Aspecto de un teléfono móvil después del tratamiento con COAP saturado en agua acidificada a 150 bar, 60°C por 15 min. ....	234
<b>Figura 5.10.</b> Aspecto de un pendrive sometido a varios tratamientos con CO <sub>2</sub> modificado con ácido peroxiacético y agua introducido a 150 bar y temperaturas comprendidas entre 40 y 60°C. ....	234



## **RESUMEN**

En esta tesis se investigó la eficacia del CO<sub>2</sub> a alta presión (COAP) en la inactivación de tres tipos de esporas de *bacillus* que son biocontaminantes habituales y muy resistentes a los tratamientos de esterilización convencionales. El CO<sub>2</sub> está disponible y tiene bajo coste. Se trata de un disolvente seguro que se encuentra en alimentos y bebidas de forma natural. A alta presión tiene capacidad esporicida.

En el **Capítulo 2** se estudió la inactivación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* que es un bacilo formador de esporas que provoca que los zumos de frutas clarifiquen. Pero la principal característica de contaminación por estos microorganismos es un olor y sabor medicinal o fenólico.

Es altamente resistente a regímenes típicos de pasteurización y está adaptado a medios ácidos. Sin embargo, el COAP fue capaz de inactivar las esporas de *A. acidoterrestris* en crema de manzana en cuatro órdenes de magnitud a 30 ° C y 100 bar después de 30 min. Por otro lado, el efecto letal del COAP fue independiente del efecto térmico, ya que la aplicación de calor seco sin CO<sub>2</sub> a la misma temperatura no causó ninguna inactivación. Un flujo elevado de CO<sub>2</sub> favoreció el contacto del COAP con la crema mejorando el grado de inactivación.

El tratamiento con COAP no afectó al color de la crema, que es un parámetro muy asociado a la calidad, ni tampoco a las propiedades reológicas de la crema; aunque hubo una ligera reducción en la vitamina C.

En el **Capítulo 3** se estudió la inactivación de las esporas de *B. cereus* porque es la biocontaminación mas resistente de especias y hierbas, entre ellas el pimentón que se utiliza en la cocina española como ingrediente y en la preparación de embutidos. El *B. cereus* puede causar vómitos y diarrea.

La inactivación de las esporas de *B. cereus* suspendidas en agua fue progresiva con la temperatura de aplicación del COAP, pero la inactivación total no se logró hasta alcanzar 80 °C a 300 bar durante 45 min. Parece que una vez activadas las esporas de *B. cereus*, serían atacadas por el COAP causando su inactivación a más bajas temperaturas que con tratamiento térmico convencional que requeriría más de 100 °C según datos extrapolados de los obtenidos en este trabajo.

El efecto de la presión fue leve pues sólo se encontró una diferencia de una reducción logarítmica en el grado de inactivación entre 100 y 350 bar. Esta mejora se asoció a la superior disolución del CO<sub>2</sub> y a la consecuente reducción del pH. La acidez promovió la inactivación de las esporas de *B. cereus* pues la inactivación alcanzada por COAP fue casi insignificante cuando las esporas se suspendieron en una solución tamponada.

Para lograr cuatro reducciones logarítmicas operando a 70 °C y 300 bar, fue necesario emplear 45 min de contacto en semicontinuo mientras que sólo se requirieron 15 min en contacto continuo. Contrariamente, solo se lograron dos ciclos de inactivación en operación discontinua en 60 min. Estos resultados indicaron la importancia de una llevar a cabo la operación con un elevado nivel de carbonatación y turbulencia.

Por comparación con datos previos de la inactivación de la microbiota del pimentón (mayoritariamente esporas de *B. cereus*), se dedujo que es mucho más difícil inactivar estas esporas en alimentos que en agua, por la posible protección de grasas y nutrientes y por el importante impacto que tiene el agua en el efecto esporicida del COAP.

Dada la dificultad de inactivar las esporas de *B. cereus* una vez contaminaban el pimentón, en el **Capítulo 4** se exploró el uso de aditivos. Primero se estudió la aplicación de aceite esencial de orégano (AEO) y luego en combinación con COAP.

El AEO solo fue capaz de inactivar las formas vegetativas de la carga microbiana natural del pimentón. Por el contrario, aplicado junto con el CO<sub>2</sub> a 100 bar y 80 °C logró una reducción del 99,5%, del recuento total de microorganismos en 30 min. El pimentón tuvo que ser humedecido a un 35%. Sin embargo, la humedad permitida para almacenamiento se limita a 11% por ley. Además, la dosis efectiva de aceite esencial de orégano (2,6% en masa respecto del pimentón) superó con creces el nivel de aceptación organoléptico que se estableció como 200 ppm (0,02%) por panelistas entrenados. Para cumplir con ambos requisitos, el procedimiento se modificó incluyendo una segunda etapa en la que se aplicó COAP solo para eliminar el exceso de aceite esencial y agua. Así, el paso aislado del COAP durante 20 min fue suficiente para que el olor fuese imperceptible.

En el **Capítulo 5** se exploró la efectividad del COAP en la inactivación de esporas de *B. thuringiensis* como simulante de las esporas de *B. anthracis* (Ántrax), dado que comparten similar genoma y tienen la misma resistencia. Estos



microorganismos son la principal amenaza de bioterrorismo. Así que se estudió su inactivación en el equipamiento de combatiente.

La presencia de agua en proporciones que oscilaron entre el 20-30% respecto del material a tratar fue imprescindible para lograr la esterilización de las esporas de *B. thuringiensis*. El agua se introdujo de forma continua en pequeñas cantidades (<1%) arrastrado por el CO<sub>2</sub>, para no causar un impacto negativo en los materiales que no podían mojarse. El caudal de CO<sub>2</sub> tuvo que ser elevado para generar fuerte turbulencia y buen contacto con los materiales, no así la presión que tuvo un mínimo impacto. La reducción del pH fue un parámetro clave para conseguir la esterilización a condiciones menos agresivas. Así, utilizando CO<sub>2</sub> mezclado con el agua acidificada con ácido cítrico a pH 3,9, se pudo lograr la esterilización de bacterias que se podrían utilizar como armas biológicas, a 150 bar y 60°C en un breve periodo de tiempo de 15 min. Cuando se adicionó cantidad suficiente de ácido cítrico para rebajar el pH a 3,3, se logró la muerte de las esporas a tan sólo 45°C. Si el ácido era peroxiacético, que es además un potente oxidante, esa temperatura se pudo rebajar a 40 °C. Sin rebajar tanto el pH, con una mezcla de isopropanol y agua también se logró a 40 °C. El procedimiento fue patentado WO2016083653.

Esta forma de operar y las condiciones tan poco agresivas del tratamiento permitieron preservar la calidad de los tejidos técnicos y la funcionalidad de varios dispositivos electrónicos testados para poder reutilizarlos. Ahora deben tratarse como residuos biológicos peligrosos con el coste asociado.





## **SUMMARY**

This thesis investigated the efficacy of high pressure CO<sub>2</sub> (HPCD) in the inactivation of three types of *bacillus* spores that are common biocontaminants and very resistant to conventional sterilization treatments. CO<sub>2</sub> is available and has low cost. It is a safe solvent that is found in food and beverages naturally. At high pressure it has sporicidal capacity.

In Chapter 2, it was studied the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris*, which is a spore-forming *bacillus* that causes clarification of fruit juices. But the main characteristic of contamination by this microorganism is a medicinal and phenolic smell and taste.

It is highly resistant to typical pasteurization regimes and is adapted to acidic media. However, HPCD was able to inactivate *A. acidoterrestris* spores in apple cream in four orders of magnitude at 30 ° C and 100 bar after 30 min. On the other hand, the lethal effect of HPCD was independent of the thermal effect, since the application of dry heat without CO<sub>2</sub> at the same temperature did not cause any inactivation. A high CO<sub>2</sub> flow rate favored the contact of the HPCD with the cream, improving the degree of inactivation.

The treatment with HPCD did not affect the color of the cream, which is a parameter very associated to the quality, nor to the rheological properties of the cream; although there was a slight reduction in vitamin C.

In Chapter 3 the inactivation of *B. cereus* spores was studied because it is the most resistant biocontamination of spices and herbs. Among them, paprika is used in Spanish cuisine as an ingredient and in the preparation of sausages. *B. cereus* can cause vomiting and diarrhea.

Inactivation of *B. cereus* spores suspended in water was progressive with the application temperature of HPCD, but total inactivation was not achieved until reaching 80 ° C at 300 bar for 45 min. It seems that once activated, the *B. cereus* spores would be attacked by the HPCD causing their inactivation at lower temperatures than with conventional heat treatment that would require more than 100 °C according to the data extrapolated from this work.

The effect of the pressure was slight as only a difference of a log reduction in the degree of inactivation between 100 and 350 bar was found. This improvement was associated with the superior dissolution of CO<sub>2</sub> and the consequent reduction of pH. The acidity promoted the inactivation of *B. cereus* spores because the inactivation achieved by HPCD was almost insignificant when the spores were suspended in a buffered solution.

To achieve four log reductions operating at 70 ° C and 300 bar, it was necessary to use 45 min of semi-continuous contact while only 15 minutes were required in continuous contact. In contrast, only two cycles of inactivation were achieved in discontinuous operation in 60 min. These results indicated the importance of carrying out the operation with a high level of carbonation and turbulence.

Compared with previous data on the inactivation of the paprika microbiota (mainly *B. cereus* spores), it was concluded that it is much more difficult to inactivate these spores in food than in water, because of the possible protection of fats and nutrients and the important impact that water has in the sporicidal effect of HPCD.

Given the difficulty of inactivating *B. cereus* spores once they contaminated paprika, the use of additives was explored in Chapter 4. First, the application of essential oil of oregano (AEO) and then in combination with HPCD was studied.

The AEO was only able of inactivating the vegetative forms of the natural microbial burden of paprika. On the contrary, applied together with the CO<sub>2</sub> at 100 bar and 80 °C achieved a reduction of 99.5%, of the total count of microorganisms in 30 min. The paprika had to be moistened to 35%. However, the allowed humidity for storage is limited to 11% by law. In addition, the effective dose of oregano essential oil (2.6% by mass of paprika) far exceeded the level of organoleptic acceptance that was set at 200 ppm (0.02%) by trained panelists. To meet both requirements, the procedure was modified including a second step in which HPCD was applied only to remove excess essential oil and water. Thus, the isolated passage of HPCD for 20 min was enough to make the odor imperceptible.

In Chapter 5 the effectiveness of HPCD in the inactivation of *B. thuringiensis* spores as a simulant of *B. anthracis* spores (Anthrax) was explored, since they share a similar genome and have the same resistance. These microorganisms are the main threat of bioterrorism. So their inactivation in the fighter equipment was studied.

The presence of water in proportions ranging from 20-30% with respect to the material to be treated was essential to achieve the sterilization of *B. thuringiensis* spores. Water was continuously introduced in small amounts (<1%) carried by CO<sub>2</sub>, so as not to have a negative impact on materials that could not be wetted. The CO<sub>2</sub> flowrate had to be raised to generate strong turbulence and good contact with the materials, but not the pressure that had a minimal impact. The pH reduction was a key parameter to achieve sterilization at less aggressive conditions. Thus, using CO<sub>2</sub> mixed with water acidified with citric acid to pH 3.9, it was possible to achieve the sterilization of bacteria that could be used as biological weapons, at 150 bar and 60 ° C in a short period of 15 min. When sufficient citric acid was added to lower the pH to 3.3, the spores were killed at only 45 ° C. If the acid was peroxyacetic, which is also a potent oxidant, that temperature could be lowered to 40 ° C. It was also possible to achieve sterilization at 40 ° C, with a mixture of isopropanol and water without lowering so much the pH. The process was patented, WO2016083653.

This way of operating and the less aggressive conditions of the treatment allowed to preserve the quality of the technical fabrics and the functionality of several electronic devices tested to be able to reuse them. They must now be treated as hazardous biological waste with the associated cost.







# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1.1. IMPACTO SANITARIO Y ECONÓMICO DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIANA DE ALIMENTOS

La contaminación microbiana de alimentos tiene un importante impacto en el ámbito sanitario. Unas 582 millones de personas enferman cada año en el mundo, de las que 351.000 fallecen, según los últimos cálculos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). De ellos, el 40% son niños menores de cinco años (OMS, 2015).

Aunque la situación es especialmente grave en países más pobres, todos se ven afectados por estas contaminaciones. La propia OMS recuerda el caso de los brotes de soja contaminados en Alemania en 2011 que causó 1.200 millones de euros en indemnizaciones a los granjeros, con 215 millones en ayudas de emergencia a 22 países. Otra prueba de que no se trata de una situación aislada es que el nombre de los tres patógenos más frecuentes en estas crisis, *S. typhi* (52.000 muertes), *E. coli* (37.000 muertes) y *norovirus* (35.000 muertes) es familiar a los ciudadanos occidentales.

Los alimentos insalubres causan más de 200 enfermedades. Tan sólo las enfermedades diarreicas transmitidas por los alimentos y el agua causan la muerte de unos 2 millones de personas al año, en su mayoría niños. En España, en el año 2013 se produjeron 19 brotes de toxiinfecciones alimentarias (memoria 2013, agencia española de seguridad alimentaria y nutrición). En junio de 2016, dos bomberos en Girona desarrollaron botulismo causado por *Clostridium botulinum* de una conserva de judías (Mouzo, 2016).

La contaminación de los alimentos puede producirse en cualquiera de las etapas del proceso de fabricación o de distribución, aunque la responsabilidad recaerá

principalmente en el productor. Se estima que a nivel mundial las pérdidas poscosecha de frutas y hortalizas causadas por microorganismos, son del orden de 5-25% en países desarrollados y 20-50% en países en desarrollo (Infoagro, 2014).

Sin embargo, una buena parte de las enfermedades transmitidas por los alimentos son causadas por alimentos que han sido preparados o manipulados de forma incorrecta en el hogar, en establecimientos que sirven comida o en los mercados.

## **1.2. CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA POR BACTERIAS ESPORULADAS**

Las bacterias esporuladas son unas de las mayores responsables de las contaminaciones alimentarias. Tres especies de esporulados *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus*, son bien conocidas por producir toxinas que pueden causar enfermedad en hombres y animales. Son especialmente importantes en la contaminación de alimentos deshidratados y de bajo contenido ácido envasados en latas, botellas, bolsas o cualquier otro recipiente hermético que se procesa por calor.

La alteración de los alimentos por las bacterias esporuladas fue descubierta por Pasteur durante sus investigaciones sobre la fermentación del ácido butírico en los vinos. Pasteur fue capaz de aislar un microorganismo que denominó *Vibrion butyrique*, ahora llamado *Clostridium butyricum*. Paralelamente las endoesporas de *bacillus* fueron descubiertas por Ferdinand Cohn y Robert Koch en 1876. Durante sus investigaciones sobre el bacilo de ántrax surgieron sus postulados; con ellos se probaba si una enfermedad era causada por un microorganismo específico y también condujeron al

desarrollo de las técnicas de cultivos puros. Por primera vez, los estudios de Pasteur y Koch condujeron a la asociación entre actividad microbiana y la seguridad y la calidad de los alimentos.

El género *Bacillus* engloba a las bacterias gram-positivas, de morfología bacilar, aerobias, capaces de formar endosporas. Las cepas de *Bacillus* son catalasa-positivas, que junto a la producción aerobia de esporas son las propiedades que las distinguen del género *Clostridium*. De las 34 especies actualmente pertenecientes al género *Bacillus*, solo dos han sido reconocidas como patógenos comunes: *B. cereus* y *B. anthracis*.

Las esporas de *B. cereus* son muy frecuentes en los alimentos y se pueden encontrar fácilmente en la leche, cereales, almidones, infusiones, especias y otros productos desecados. También se hallan en la superficie de carnes y aves de corral, probablemente por contaminación procedente del suelo o el polvo. Además, provocan la alteración de la leche fresca o pasteurizada, y alimentos que contienen leches deshidratadas, tales como las papillas para bebés. Pueden producir una enterotoxina termolábil que provoca una enfermedad diarreica, y una toxina termoestable responsable de la sintomatología emética en el hombre. (Doyle *et al.* , 2001).

El *B. anthracis* es el agente causante del ÁNTRAX o CARBUNCO. Es un Bacilo gram positivo encapsulado, no móvil y aeróbico, formador de esporas. Presenta tres factores de virulencia que son: una toxina edémica, una toxina letal y un antígeno capsular antifagocítico. Genera infección cutánea, shock respiratorio y grave diarrea, que en muchos casos son mortales. Es capaz de infectar por contacto con lana, pieles, cuero u otros productos de pelo de animales infectados, por inhalación de esporas o por

ingestión de alimentos poco cocinados e infectados con la bacteria. La mayoría de las infecciones (casi el 95%) son por contacto.

Sin duda, la formación de esporas *B. anthracis* merece su estatus como el principal agente de amenaza biológica debido a su capacidad para formar esporas resistentes e infectar a individuos por diversos medios incluyendo vía transmisión de aerosol. El potencial ofensivo de esta bacteria hizo que se utilizase como armamento por un gran número de estados, incluyendo Japón, Reino Unido, Estados Unidos, la antigua Unión Soviética y más recientemente Iraq. Por tanto, *B. anthracis* tiene una larga historia como bio-arma (Russell y Ayliffe's, 2013).

A pesar de no ser patógenas, se han identificado tres especies de *Alicyclobacillus* que provocan alteraciones en frutas y zumos. Estas tres especies son *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius* y *A. pomorum*. *Alicyclobacillus* es una bacteria Gram positiva, termoacidofílica, aerobia estricta que forma endosporas. Las esporas de *A. acidoterrestris* se encuentran en la tierra, así que se piensa que la fuente de contaminación es la fruta fresca, que se introduce en el procesamiento sin una limpieza apropiada (Groenewalda *et al.*, 2009). El daño causado a zumos de frutas es difícilmente detectable porque provoca que algunos zumos de frutas clarificados tengan un ligero sedimento. Pero la principal característica de contaminación por este microorganismo es un olor y sabor medicinal o fenólico, causado por Guaiacol, 2,6 dibromofenol o 2,6 diclorofenol.

Las esporas de *Bacillus* son mucho más resistentes que las células vegetativas al calor, a los conservantes alimentarios, a la presión hidrostática, pH extremos y a la irradiación.

Por ello, pueden sobrevivir durante muchos años en el suelo. Curiosamente se han encontrado esporas viables en algunas pirámides egipcias. Esta altísima resistencia es debida a su especial estructura.

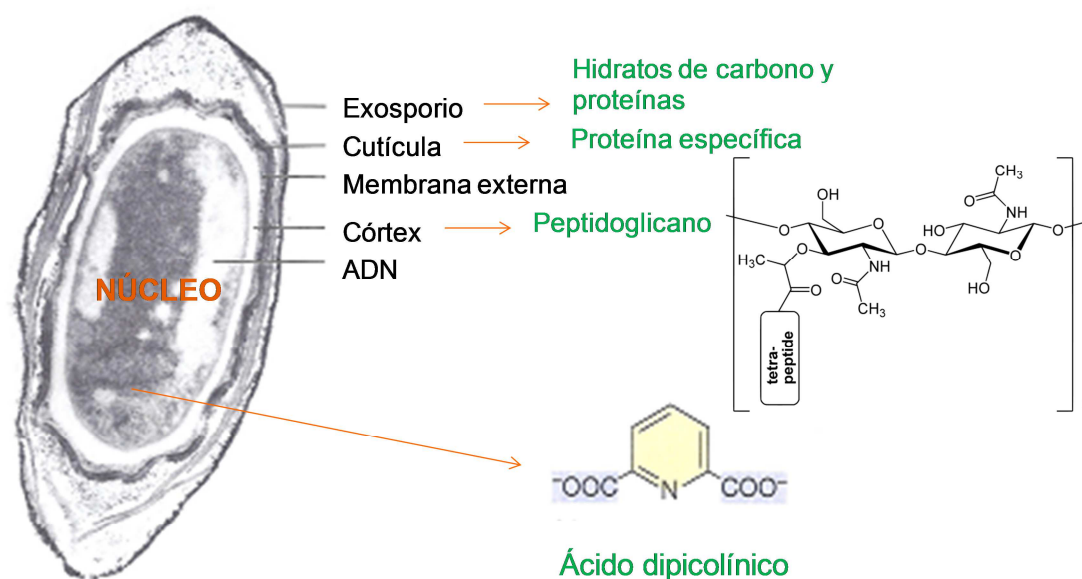
### **1.3. ESTRUCTURA DE LAS ESPORAS**

Además de diferentes propiedades fisiológicas, la spora latente tiene una estructura muy diferente que la de una célula en crecimiento, ya que la spora tiene una serie de capas y componentes no presentes en las células en crecimiento (Setlow, 2006). Un esquema de dicha estructura se muestra en la Figura 1.1. El exosporio es la capa más externa de la spora. Se compone de hidratos de carbono y proteínas, aunque no se sabe qué papel juega en las propiedades de resistencia de esporas.

Por debajo del exosporio está la cutícula, que a su vez puede estar compuesta de varias capas diferentes formadas en gran parte de proteínas. La cutícula es importante en la resistencia de las esporas a algunos productos químicos y al ataque lítico enzimático (de lisozima y similares).

A continuación se encuentra la membrana externa. En ella, está el córtex que se compone en gran medida de peptidoglicano (PG). Parece ser extremadamente importante en el establecimiento y mantenimiento de latencia de esporas, probablemente al causar y mantener el bajo contenido de agua en la región central o núcleo de la spora. Inmediatamente debajo está la pared de la célula germinante, también compuesta por PG.





**Figura 1.1.** Esquema de la estructura de una espora latente.

La siguiente capa es la membrana interior que en las esporas latentes esta significativamente comprimida y tiene extremadamente baja permeabilidad a pequeñas moléculas incluyendo agua (Westphal *et al.*, 2003, Cortezzo *et al.*, 2004b, Cortezzo y Setlow, 2005). Esta baja permeabilidad parece ser muy importante en restringir el acceso de los productos químicos que dañan el ADN (Cortezzo y Setlow, 2005). Además, en esta membrana se encuentra un gran número de proteínas que son esenciales para la germinación de la espora y deben funcionar en ella (Setlow, 2003).

En el centro está el núcleo que contiene la mayoría de las enzimas de la espora, además de la maquinaria de síntesis de las proteínas y el ADN. El contenido en agua es muy bajo. En contraste con las células en crecimiento en las que cerca del 80% es agua, este valor en el núcleo de la espora oscila entre 25 y 55%. Implicada en la reducción del contenido en agua está una molécula pequeña, el ácido 2,6-dicarboxílico de piridina (ácido dipicolínico o DPA). El DPA está probablemente presente en el núcleo de forma

de quelato con cationes divalentes, predominantemente  $\text{Ca}^{2+}$ , formando Ca-DPA (Gerhardt y Marquis, 1989). El DPA se produce durante la esporulación y se acumula en el núcleo de la espora hasta en un 20%. Es importante en la protección del ADN y de una importante variedad de otros tipos de daños. Las proteínas ácido soluble de tipo  $\alpha/\beta$ - (SASP) son el segundo tipo de moléculas especiales que hay presentes en el núcleo (Setlow, 1994, 2006, Driks, 2002b, Paidhungat y Setlow, 2002). Estas proteínas son pequeñas (65 a 75 aminoácidos) y suponen alrededor de un 5% del total de las proteínas de las esporas. Son importantes factores en la resistencia de las esporas a agentes externos. Otra propiedad bioquímica muy relevante del núcleo es que su pH es de 1.0 a 1.5 unidades menor que el de una célula en crecimiento que es generalmente pH 7.5 a 8.0 (Setlow, 1994, Paidhungat y Setlow, 2002). El pH del núcleo de la espora crece al de una célula en crecimiento en los primeros minutos de germinación a través de la excreción de protones.

#### 1.4. LEGISLACIÓN

Dada la gran resistencia de las esporas de bacterias y debido a su frecuente presencia en productos recogidos del campo, la legislación alimentaria recoge máximos permitidos de *B. cereus* y de especies de *Clostridium*. Sin embargo, las empresas normalmente exigen niveles más bajos en las materias primas con las que elaboran sus productos alimentarios. Incluso exigen el recuento de microorganismos que sin ser patógenos son causantes del deterioro en almacenamiento de los alimentos. Por ejemplo, los productores de derivados de frutas exigen un nivel máximo para *Allycyclobacillus acidoterrestris*.

Además hay definidos criterios para los productos que se encuentran en el mercado y para controlar el correcto funcionamiento de los procesos de producción, con el fin de evitar la presencia o incremento de microorganismos indeseables en los alimentos. La Tabla 1.1. muestra a modo de ejemplo, los límites permitidos de esporas y los principales patógenos en especias y en derivados de frutas por la relevancia que tienen para este trabajo (AESAN, 2010).

**Tabla 1.1.** Limites microbiologicos permitidos en alimentos.

Alimentos	Legislación o Recomendación	Enterobacterias Coliformes	<i>Salmonella, Shigella, Mohos, Listeria monocytogenes</i>	Otros limites y comentarios
Espicias ( <i>Capsicum</i> spp, nuez moscada, otras especias y hierbas)	Recomendación Comisión UE 2004/24/CE	Enterobacterias n=5, c= 1, m=10 M=100	<i>Salmonella</i> n=5, c=0 Ausencia en 25 g	<i>Clostridium perfringens</i> n=5, c=1, m=100, M=1.000 <i>Bacillus cereus</i> n=5, c=1, m= 1.000, M= 10.000
	Como referencia RD 2242/84 BOE 22/12/84 BOE 13/4/85	10 ufc/ g	<i>Salmonella</i> Aus. /25 g	Sulfito reductores: 103 u.f.c/ g y ausencia de patógenos. Los criterios microbiológicos del R.D.2242/1984 han sido derogados por R.D. 135/2010 En el anexo del Real Decreto 2242/1984 se establece el % máximo de humedad de 43 variedades de productos terminados.
Condimentos y especias	Reglamentos CE 2073/2005 y 1441/2007 D.O.U.E. 07/12/2007		<i>Listeria monocytogenes</i> n=5, c=0 Ausencia en 25 g	De aplicación sólo si pueden favorecer el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> y en la fase anterior a la que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido. Considérese que no pueden favorecer el crecimiento de <i>Listeria</i> los alimentos con $a_w < 0.92$ .
			<i>Listeria monocytogenes</i> n=5, c=0-100 ufc/g	Fase aplicación del criterio: productos comercializados durante su vida útil.

Alimentos	Legislación o Recomendación	Enterobacterias Coliformes	<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , Mohos, <i>Listeria monocytogenes</i>	Otros límites y comentarios
Frutas y hortalizas troceadas (listas para el consumo). (ejemplos; ensaladas 4ª gama y frutas 5ª gama)	Reglamento CE 2073/2005 modificado por el Reglamento 1441/2007 D.O.U.E. 07/12/2007	<i>E.coli</i> n=5, c=2 m=100 M=10 <sup>3</sup>	<i>Salmonella</i> n=5, c=0 Ausencia en 25 g	<i>E.coli</i> se aplica en los productos durante su proceso de elaboración. <i>Salmonella</i> se aplica en los productos comercializados durante su vida útil.
			<i>Listeria monocytogenes</i> n=5, c=0 Ausencia en 25 g	Fase de aplicación del criterio: antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido.
			<i>Listeria monocytogenes</i> n=5, c=0-100 ufc/g	Fase de aplicación del criterio: Productos comercializados durante su vida útil.
12 Zumos de fruta confituras, jaleas, mermelada de frutas, crema de castaña y mermelada de frutas.	RD 863/03 BOE, 5/7/03  Reglamentos CE 2073/2005 CE 1441/2007 D.O.U.E. 07/12/2007			La legislación no recoge normas microbiológicas. El R.D. 863/03 de 5/7/03 establece que este grupo de alimentos queda sometido a los requisitos sanitarios establecidos en la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración y venta de conservas vegetales regulada por R.D. 2420/1978.
			<i>Listeria monocytogenes</i> n=5, c=0 Ausencia en 25 g	De aplicación sólo si pueden favorecer el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> y en la fase anterior a la que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido.
			<i>Listeria monocytogenes</i> n=5, c=0-100 ufc/g	Fase de aplicación del criterio: productos comercializados durante su vida útil.

**ACLARACIONES Y DEFINICIONES**

**n:** número de unidades de que se compone la muestra.

**c:** número de unidades de la muestra cuyo número de bacterias podrá situarse entre **m** y **M**.

**m:** valor umbral del número de bacterias.

**M:** valor límite del número de bacterias.

**ufc /g:** unidad formadora de colonia por gramo.

**Interpretación de los resultados de las pruebas:****Si existen valores m y M:**

- satisfactorio, si todos los valores observados son < m.
- aceptable, si un máximo de c/n valores se encuentran entre m y M y el resto de los valores observados son < m.
- insatisfactorio, si uno o varios valores observados son > M o más de c/n valores se encuentran entre m y M.

## 1.5. TÉCNICAS DE CONTROL MICROBIOLÓGICO EN ALIMENTOS

La esterilización con calor húmedo debe realizarse a temperaturas superiores a 100°C para destruir las endosporas bacterianas; requiriendo la utilización de vapor saturado bajo presión. La esterilización con vapor de material a pequeña escala y en operación en discontinuo se realiza en un **autoclave**, aparato similar a una olla a presión. Se hierve agua para producir vapor, que pasa a través de una cubierta al interior de la cámara del autoclave. Se expulsa el aire que inicialmente se encuentra en la cámara hasta que ésta queda llena de vapor saturado y se cierran las salidas. El vapor saturado y caliente continúa entrando en la cámara hasta que se alcanza la temperatura y presión deseadas, normalmente, 121 °C y 1 bar de presión. A esta temperatura, el vapor saturado puede destruir en 10-12 minutos todas las células vegetativas y endosporas presentes en un volumen pequeño de muestra. El tratamiento se continúa durante 15 minutos para conseguir un margen de seguridad. Evidentemente, grandes contenedores o recipientes de muestras líquidas requerirán tratamientos más prolongados. Por ejemplo, 5 litros de líquido pueden precisar casi 70 minutos. Debido a estos posibles inconvenientes, se suele esterilizar en el autoclave un indicador biológico junto con el resto del material. Este indicador consiste normalmente en una ampolla estéril con un medio y una tira de papel cubierta de esporas de *Bacillus* o *Clostridium*.

Después del tratamiento en el autoclave, se rompe asépticamente la ampolla y el cultivo se incuba durante varios días. Si la bacteria indicadora no crece en el medio, se infiere que los materiales han quedado esterilizados. A veces se introduce también en el autoclave una cinta especial con la palabra *estéril* escrita, o una tira de papel indicador que cambia de color después de un tratamiento suficiente con calor. Si la palabra

aparece en la cinta o si el color cambia después del tratamiento, se supone que el material está estéril. Estos métodos son prácticos y ahorran tiempo, pero no son tan fiables como el uso de endosporas bacterianas.

Por otro lado, los materiales sólidos se esterilizan mejor en ausencia de agua mediante **esterilización por calor seco**. Los materiales que se van a esterilizar se colocan en una estufa a una temperatura de 160 a 170 °C durante 2 a 3 horas. La destrucción microbiana se produce aparentemente como consecuencia de la oxidación de los constituyentes celulares y la desnaturalización de las proteínas. Aunque el calor del aire seco es menos eficaz que el húmedo, posee ventajas claras, las endosporas de *Clostridium botulinum* son destruidas en 5 minutos a 121 °C por calor húmedo, pero son necesarias 2 horas a 160 °C, por calor seco. El calor seco no corroe utensilios de cristal ni metálicos, como lo hace el calor húmedo y puede emplearse para esterilizar polvo, aceite y otros materiales diversos. A pesar de estas ventajas, la esterilización por calor seco es lenta e inapropiada para materiales termosensibles, como biopolímeros (Prescott *et al.*, 2002).

Además, el tratamiento térmico puede causar reducción de las propiedades organolépticas y nutricionales en los alimentos. Y el uso de conservantes químicos está cada vez más restringido y es muy rechazado por los consumidores; por eso se investiga más y más el reemplazo de las técnicas de conservación tradicionales por nuevas técnicas que sean seguras. Entre ellas, la alta presión hidrostática, los campos de pulsos eléctricos, la irradiación y el uso de envases activos junto con antimicrobianos naturales tales como aceites esenciales (Barbosa-Canovas *et al.*, 1999 y Casp y Abril, 2003).

La alta presión hidrostática se realiza en recipientes a presiones que oscilan entre 3000 y 17000 bar desde varios segundos a varios minutos, por lo que es una operación cara que requiere diseños y medidas avanzadas de seguridad. No obstante, en España ha sido desarrollada con mucho éxito por la empresa Hiperbaric (Hhiperbaric, 2012).

La irradiación de los alimentos no es una tecnología nueva, es mucho más antigua y ha sido mucho más estudiada que otros procesos de conservación introducidos en la industria alimentaria en los últimos años. La irradiación es ampliamente utilizada en todo el mundo para esterilizar suministros médicos. Fue patentada para la conservación de alimentos en 1905 por dos científicos británicos y fue utilizada por primera vez en Estados Unidos en 1921 para inactivar el parásito humano *Trichinella spiralis*, que contaminaba el músculo del cerdo. La literatura biomédica de los años 1920 a 1930 contiene numerosos artículos sobre los efectos de los rayos-X sobre los alimentos y sus constituyentes (Barbosa-Canovas *et al.*, 1999).

Generalmente los alimentos son irradiados con rayos gamma de una fuente radioisotópica, con electrones o con rayos-X generados utilizando un acelerador de electrones.

En el mercado de alimentos, el nicho para los productos irradiados es muy pequeño, incluso en los países donde este procedimiento de conservación está permitido. Los aspectos de regulación y seguridad del proceso de irradiación, factores de equipamiento y costes, y la necesaria aceptación del consumidor contribuyen a la dudosa comercialización de los alimentos irradiados.



## **1.6. TÉCNICAS DE CONTROL MICROBIOLÓGICO EN MATERIALES SENSIBLES**

En materiales sensibles no alimentarios el grado requerido de inactivación es lo que en bibliografía inglesa se define como SAL (Sterility Assurance Level). La esterilidad de un producto u objeto significa la ausencia completa de microorganismos viables. Actualmente se requiere un nivel de aseguramiento de esterilidad (SAL) de  $10^{-6}$  para procedimientos de esterilización, es decir, una probabilidad de no más de un microorganismo viable en un millón de artículos esterilizados del producto final.

Tanto en el ámbito alimentario como en la esterilización de materiales sensibles es necesario verificar la eficacia de la técnica. Para ello, se utilizan indicadores químico y biológicos.

Los indicadores químicos (ISO 11140) son dispositivos que contiene sustancias químicas que cambian de color o estado cuando se exponen a una o más variables críticas del proceso de esterilización como temperatura-humedad o temperatura-concentración del agente esterilizante.

Los indicadores biológicos (ISO 11138) son dispositivos preparados de esporas no patógenas y altamente resistentes a los procesos de esterilización y por lo tanto son útiles y eficaces para establecer la capacidad del ciclo de esterilización para destruir microorganismos específicos, que se sabe que son más resistentes al proceso que se está probando.

Las esporas utilizadas provienen de *Bacillus atrophaeus* como control biológico de la esterilización por calor seco y óxido de etileno, de *Bacillus pumilus* para irradiación y de *Bacillus stearothermophilus* para la esterilización por vapor a presión, plasma de peróxido de hidrogeno y formaldehído.

Estos indicadores certifican la muerte de microorganismos una vez terminado el proceso de esterilización.

Para alcanzar este grado de inactivación en materials sensibles se utiliza la irradiación comentada anteriormente, la aplicación de plasma, luz pulsada, la irradiación ultravioleta y agentes químicos.

Conocido como el cuarto estado de la materia, se define al plasma gaseoso, como una nube de partículas cargadas positiva y negativamente, junto a partículas atómicas neutras y otras especies moleculares. Este estado de la materia puede ser producido a través de campos eléctricos o magnéticos. Durante mucho tiempo se intentó adaptar el fenómeno de plasma a baja temperatura a los procesos de esterilización.

En la búsqueda del precursor ideal a fin de ser utilizado en la esterilización de materiales, se estudiaron distintos productos químicos, entre ellos el argón y el hidrogeno, pero resultaron ser muy lentos. También se ensayó con alcoholes, ácidos y glutaraldehido pero dejaban residuos no inertes. Finalmente se concluyó que el mejor precursor para la formación del plasma gaseoso para esterilización, sería el peróxido de hidrógeno líquido.

La luz pulsada es un método en el que se utilizan pulsos intensos y de corta duración de luz. El espectro de luz utilizado par esterilización incluye longitudes de onda desde el ultravioleta a longitudes de onda en la región del infrarrojo cercano. El material a esterilizar se expone al menos a un pulso de luz teniendo una densidad energética en el intervalo de alrededor  $0,01$  a  $50 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  en la superficie, utilizando una distribución de longitudes de onda tal que al menos el 70% de la energía electromagnética se distribuye en un intervalo de longitudes de onda desde  $170\text{nm}$  a  $2600 \text{ nm}$ .

La radiación ultravioleta constituye una de las franjas del espectro electromagnético y posee mayor energía que la luz visible. La energía UV se halla en el espectro electromagnético entre la luz visible y los rayos X y puede ser mejor medida como radiación invisible.

La irradiación con rayos UV de los microorganismos presentes en el agua provoca una serie de daños en su molécula de ADN, que impiden la división celular, con ello, su reproducción. En particular, la radiación con longitudes de onda de menos de aproximadamente  $320 \text{ nm}$  parece ser lo suficientemente energético para promover reacciones de biomoléculas.

Entre los agentes químicos, se puede utilizar el óxido de etileno, compuestos fenólicos, compuestos de amonio cuaternario, derivados clorados yodóforos, alcoholes, formaldehído, glutaraldehído, peróxido de hidrógeno y ácido peracético. Esta forma de esterilización se fundamenta en que algunas sustancias químicas tienen la capacidad de promover una o más reacciones químicas capaces de producir la muerte de los microorganismos.

Sin embargo, todas estas técnicas son muy agresivas y por tanto, pueden causar alteraciones en las propiedades físicas, químicas y organolépticas de los productos tratados. En el ámbito de los biomateriales, se utiliza sobre todo el óxido de etileno y el peróxido de acético, aunque son agentes fuertemente oxidantes y pueden dejar residuos en el producto tratado que genera preocupación en los usuarios por la toxicidad. Por esa razón, se continua buscando nuevos métodos de esterilización más suaves y respetuosos con el medio ambiente.

### **1.7. INACTIVACIÓN DE AGENTES BIOLÓGICOS MEDIANTE CO<sub>2</sub> A ALTA PRESIÓN (COAP)**

La aplicación de CO<sub>2</sub> a alta presión (COAP) ha adquirido gran interés como método para la pasteurización y esterilización de alimentos y en general, de productos sensibles. El método de conservación con COAP proporciona varias ventajas. El dióxido de carbono es inerte, barato, no tóxico, no inflamable, reciclable y fácilmente disponible en alta pureza. Además, no deja residuos después del tratamiento, dado que el CO<sub>2</sub> es gas en condiciones ambientales. Se considera que es un disolvente GRAS (generalmente reconocido como seguro), lo que significa que se puede utilizar en productos alimentarios.

Estudios publicados desde los años 90 del siglo pasado revelan que el CO<sub>2</sub> puede desactivar la mayoría de los microorganismos, bacterias, levaduras y mohos patológicos causantes del deterioro de los alimentos (Damar *et al.*, 2005, Garcia-Gonzalez *et al.*, 2007, Perrut, 2011; Zhang *et al.*, 2006).

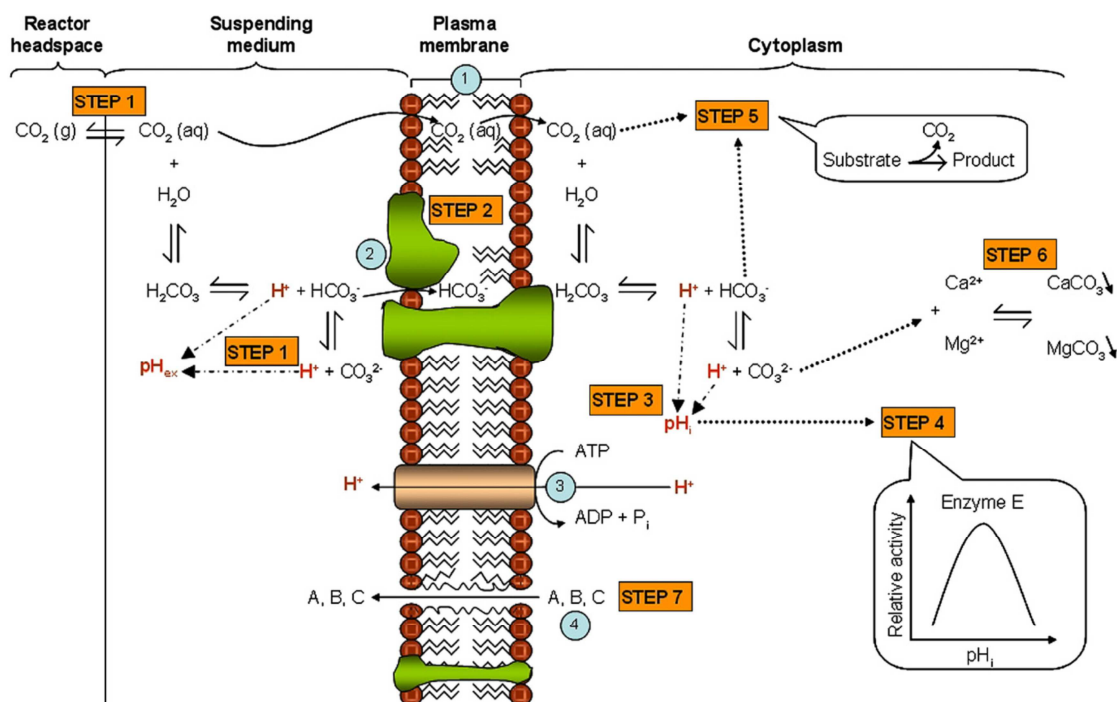
El COAP también ha demostrado desactivar ciertas enzimas, como polifenol oxidasa y peroxidasa, que causa oscurecimiento en frutas, verduras, y zumos (Hu *et al.*, 2013).

La pasteurización con COAP puede llevarse a cabo a temperaturas bajas (25-40°C) evitando los efectos negativos de la pasteurización térmica tradicional. También se ha demostrado que la presión puede ser baja (< 100 bar) lo que reduce el coste de los equipos y del gasto energético de operación (Sims *et al.*, 2003).

García-González *et al.* (2007) dilucidaron el mecanismo de acción del COAP en ambientes líquidos ricos en agua. Los diferentes pasos son los siguientes: 1) disolución del CO<sub>2</sub> presurizado en la fase líquida externa, 2) modificación de la membrana celular, 3) reducción del pH interno, 4) inactivación de las enzimas intracelulares, 5) efecto inhibidor directo del CO<sub>2</sub> molecular y del ácido carbónico producido, 6) HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el metabolismo, desorden del balance electrolítico y 7) extracción de los constituyentes vitales de las células y de las membranas celulares. Muchos de estos pasos no ocurren consecutivamente sino simultáneamente de una forma interrelacionada y compleja, como se muestra en la Figura 1.2.

Ni la efectividad ni el mecanismo de acción del COAP en formas vegetativas es aplicable a la inactivación de esporas, por la distinta estructura y la elevada resistencia de estas últimas especies, como se ha indicado en la sección 1.3.

A continuación, por la relevancia directa que tiene para esta tesis, se resume el estado del arte en la inactivación mediante COAP de esporas, primero en medios líquidos y luego en medios sólidos.



**Figura 1.2.** Esquema de cómo el CO<sub>2</sub> podría ejercer su acción letal en bacterias vegetativas. Además de los diferentes pasos en el mecanismo de inactivación, se muestra la bicapa de fosfolípidos, las proteínas integrales de la membrana, el plasma H<sup>+</sup>-ATP de la membrana y las sustancias intracelulares (García-González *et al.*, 2007).

### 1.7.1. Inactivación de esporas en medios líquidos

La Tabla 1.2. recoge un resumen de los trabajos realizados en la inactivación de esporas en medios líquidos. Los datos se ordenan por tipo de spora distinguiendo entre las esporas de bacilo, de hongos y de levaduras. Dentro de cada categoría se han ordenado a su vez en creciente grado de inactivación, medida como reducción logarítmica del recuento de esporas viables, en unidades formadoras de colonia por gramo, después del tratamiento (N) con respecto al recuento antes del tratamiento (N<sub>0</sub>). Una reducción superior a seis ciclos logarítmicos es lo que habitualmente se exige como grado de

esterilidad, como se ha indicado en la anterior sección 1.6. Para cada publicación se ha elegido las condiciones en las que mayor grado de inactivación se ha logrado.

Los estudios son numerosos y abarcan los principales microorganismos esporulados causantes del deterioro de los alimentos y de biocontaminación sanitaria. Las esporas más estudiadas son aquellas que bien están legisladas en la elaboración de alimentos (*B. cereus*, *Clostridium*), bien se utilizan como indicadores de eficacia de esterilización (*B. subtilis*, *B. pumilus* y *Geobacillus stearothermophilus*).

De este resumen se puede inferir que son más difíciles de inactivar las esporas de *bacillus* que las de hongos. En operación en discontinuo, para inactivar las esporas de *bacillus* es necesario aplicar más de 75°C y elevados tiempos de contacto. Concretamente, Watanabe *et al.* (2003b) lograron la desactivación de las esporas de *Geobacillus stearothermophilus* al tratarlas con COAP a 95°C y 300 bar durante 120 minutos. Spilimbergo *et al.* (2003a), lograron la inactivación de esporas de *Bacillus subtilis* cuando lo aplicaron a 75°C y 70 bar durante 120 minutos y Ballestra *et al.* (1998), de esporas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus fluva* cuando lo suministraron a 90°C y 50 bar durante 60 minutos.

**Tabla 1.2.** Condiciones y grado de esterilización alcanzado en la esterilización de distintos tipos de esporas mediante COAP en medios líquidos y agua.

Denominación	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Aditivos	Cantidad	Sustrato	Modo de operación	log N N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
<b>Esporas de Bacterias</b>									
Alicyclobacillus acidoterrestris	100	30	30			Agua	Semicontinuo	-5,0	Casas <i>et al.</i> , 2012
	80/100	70/65	30/40			Zumo de manzana	Discontinuo	-6,0	Bae <i>et al.</i> , 2009
	100	60	30			Crema de manzana	Semicontinuo	-6,0	Casas <i>et al.</i> , 2012
	75	45	5,2 (tiempo de residencia)			Zumo de naranja saturado en CO <sub>2</sub>	Continuo	-6,5	Sims <i>et al.</i> , 2002
B. cereus	483	40	10 (tiempo de residencia)			Leche cruda	Continuo	0	Werner <i>et al.</i> , 2006
	300	35	120			Agua	Discontinuo	-1,2	Watanabe <i>et al.</i> , 2003a
	300	60	45			Agua	Semicontinuo	-2,0	Casas y Calvo, 2013
	300	70	45			Agua	Semicontinuo	-4,0	
	300	80	45			Agua	Semicontinuo	-6,0	Park <i>et al.</i> , 2013b



Denominación	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Aditivos	Cantidad	Sustrato	Modo de operación	log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
Esporas de Bacterias									
<i>B. cereus</i>	300	50/60	60/30			Solución fisiológica	Discontinuo, microburbujas	-6,0	Ishikawa <i>et al.</i> , 1997
	300	50	80			Tampón de ácido acético-acetato (pH=4,7)	Semicontinuous, microburbujas	-6,0	Osajima <i>et al.</i> , 1997
	205	60	240			Medio	Discontinuo (seis ciclos de presión)	-8,0	Dillow <i>et al.</i> , 1999
	205	60	120			Agua	Discontinuo	-5,0	
<i>B. circulans</i>	300	50	80			Tampón de ácido acético-acetato (pH=4,7)	Semicontinuous, microburbujas	-6,0	Osajima <i>et al.</i> , 1997
<i>B. coagulans</i>	65	35	120			Agua	Discontinuo	-0,05	Furukawa <i>et al.</i> , 2004
	65	35	120	Surfactante	0,01% (w/v)	Agua	Discontinuo	-0,1	Furukawa <i>et al.</i> , 2006
	300	35	120			Agua	Discontinuo	-1,3	Watanabe <i>et al.</i> , 2003a

Denominación	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Aditivos	Cantidad	Sustrato	Modo de operación	log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
<b>Esporas de Bacterias</b>									
<i>B. coagulans</i>	300	50	80			Tampón de ácido acético-acetato (pH=4,7)	Semicontinuous, microburbujas	-6,0	Osajima <i>et al.</i> , 1997
	65	35°C (seguidos de tratamiento térmico a 90°C)	10 (seguidos de tratamiento térmico a 30°C)			Agua	Discontinuo	-6,0	Watanabe <i>et al.</i> , 2003a
	65	35	120			Agua	Discontinuo	-0,15	Furukawa <i>et al.</i> , 2004
	65	35	120	Surfactante	0,01% (w/v)	Agua	Discontinuo	-0,3	Furukawa <i>et al.</i> , 2006
	300	35	120			Agua	Discontinuo	-1,2	Watanabe <i>et al.</i> , 2003a
<i>B. licheniformis</i>	65	35°C (seguidos de tratamiento térmico a 90°C)	10 (seguidos de tratamiento térmico a 30°C)			Agua	Discontinuo	-6,0	Watanabe <i>et al.</i> , 2003a
	300	50	80			Tampón de ácido acético-acetato (pH=4,7)	Semicontinuous, microburbujas	-6,0	Osajima <i>et al.</i> , 1997

	Denominación	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Aditivos	Cantidad	Sustrato	Modo de operación	log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
	Esporas de Bacterias									
26	<i>B. macerans</i>	300	50	80			Tampón de ácido acético- acetato (pH=4,7)	Semicontinuous, microburbujas	-6,0	Osajima <i>et al.</i> , 1997
	<i>B. megaterium</i>	300	50	80			Tampón de ácido acético- acetato (pH=4,7)	Semicontinuous, microburbujas	-6,0	Osajima <i>et al.</i> , 1997
		59	60	1800			Agua	Discontinuo	-7,0	Enomoto <i>et al.</i> , 1997
	<i>B. polymyxa</i>	300	50	80			Tampón de ácido acético- acetato (pH=4,7)	Semicontinuous, microburbujas	-6,0	Osajima <i>et al.</i> , 1997
		300	45/60	60/30			Solución fisiológica	Discontinuo, microburbujas	-6,0	Ishikawa <i>et al.</i> , 1997
	<i>B. subtilis</i>	150	54	60	Peptona (antiagregante)	0,1 (% w/v)	Solución fisiológica	Semicontinuo	-0,9	Spilimbergo <i>et al.</i> , 2002
		200	54	60			Solución fisiológica	Semicontinuo	-1,1	
		70	75	24x60				Discontinuo	-7,0	

Denominación	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Aditivos	Cantidad	Sustrato	Modo de operación	log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
Esporas de Bacterias									
<i>B. subtilis</i>	300	35	120			Agua	Discontinuo	-1,2	Watanabe <i>et al.</i> , 2003a
	80	35	30				Semicontinuo (treinta ciclos por hora)	-3,5	Spilimbergo <i>et al.</i> , 2002
	300	50	80			Tampón de ácido acético-acetato (pH=4,7)	Semicontinuo	-6,0	Osajima <i>et al.</i> , 1997
	50	90	60			Suero Ringer	Discontinuo	-4,0	Ballestra y Cuq, 1997
	15	<77	60				Discontinuo	<-1,0	
	15	>82	60				Discontinuo	-7,0	
	200	91	40				Discontinuo	-5,5	Rao <i>et al.</i> , 2015
	200	91	40	Tween 80 (surfactante)	0,1 %		Discontinuo	-6,5	
	300	55	60			Solución fisiológica	Discontinuo, microburbujas	-6,0	Ishikawa <i>et al.</i> , 1997
	75	75	120			Solución salina	Discontinuo	-7,0	Spilimbergo <i>et al.</i> , 2003a

Denominación	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Aditivos	Cantidad	Sustrato	Modo de operación	log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
Esporas de Bacterias									
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	300	95	120			Agua	Discontinuo	-5,0	Watanabe <i>et al.</i> , 2003b
	14	37	<120	Lisozima	300 ppm	Caldo de cultivo	Discontinuo	Total	Sikes y Martin, 1995
<i>Clostridium sporogenes</i>						Caldo DIFCO tioglicolato acidificado con HCl (pH=4,0)		-0,9	
	55	70	120			(pH=3,0)	Discontinuo	-7,5	Haas <i>et al.</i> , 1989
						(pH=2,5)		-7,7	
	100	60	60			Solución fisiológica	Semicontinuo	-2,5	Resultados no publicados
Esporas de Hongos									
<i>Alternaria brassicicola</i>	150	46	15			Suspension	Discontinuo	-7,0	
	150	38	90			Suspension	Discontinuo	-7,0	Park <i>et al.</i> , 2012b
	150	38	45	Etanol	42 mg en 100 mL	Suspension	Discontinuo	-7,0	

Denominación	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Aditivos	Cantidad	Sustrato	Modo de operación	log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
Esporas de Hongos									
Aspergillus niger	50	50				Suero Ringer con a <sub>w</sub> = 0,99	Discontinuo	D=11 min	Ballestra y Cuq, 1997
	190	50	1.5			Disolución salina carbonatada (0,005% Tween 20)	Discontinuo, microburbujas	-7,0	Shimoda <i>et al.</i> , 2002
Aspergillus ochraceus	70	50	20			Agua	Discontinuo	-6,0	Neagu <i>et al.</i> , 2013
Byssoschlamys fulva	50	85	60			Suero Ringer	Discontinuo	-0,7 (80%)	Ballestra y Cuq, 1997
Penicillium oxalicum	168	49	20			Agua	Semicontinuo	-7,0	Park <i>et al.</i> , 2013a
	100	40	45	Etanol	0,8% (w/v)				
Ascoesporas de Levaduras									
S. cerevisiae	150	45	5,2 (tiempo de residencia)			Zumo de naranja saturado en CO2	Continuo	-5,8	Sims <i>et al.</i> , 2002

Comparando la resistencia de cinco cepas de *bacillus*: *G. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *coagulans*, *cereus* y *lincheniformes*, Watanabe *et al.* (2003b) determinaron que las de esporas de *B. subtilis* eran las más resistentes, siendo el valor D (tiempo necesario, a una determinada temperatura, para disminuir la población de microorganismos al 10%) aproximadamente 13 veces mayor que el de *B. coagulans*. Además, comprobaron que la resistencia al tratamiento con CO<sub>2</sub> no se correlacionaba con la resistencia al tratamiento térmico o a la alta presión hidrostática.

Las menos resistentes que todo este grupo son las esporas de *A. acidoterrestris* pues a tan solo 30°C y 100 bar se puede ya lograr un grado de inactivación de cuatro ciclos logarítmicos, como se reporta en el capítulo 2 de esta tesis.

Las esporas de hongos pueden ser inactivadas a 50°C en tiempos menores de una hora (Park *et al.*, 2012a, Neagu *et al.*, 2013 y Park *et al.*, 2013a). Las ascoesporas de *S. cerevisiae* también parecen ser inactivadas a temperaturas suaves; concretamente, se alcanza su inactivación total a 45°C en zumo de naranja previamente saturado en CO<sub>2</sub> operando a 150 bar (Sims *et al.*, 2002).

La capacidad esporicida del COAP aumenta con la temperatura de aplicación, como se muestra también en la Tabla 1.2. Aunque en general para las esporas de bacilos, se observa mayor dependencia con la temperatura a partir de los 75-80 °C. Watanabe *et al.*, (2006) observaron dos períodos de la representación del logaritmo del parámetro D respecto de la temperatura para *G. stearothermophilus*. El de mayor pendiente empezaba a 75 °C. Igualmente, se obtuvo menos de una reducción logarítmica en el número de esporas de *B. subtilis*, cuando las temperaturas eran < 77°C, operando entre

65 y 200 bar por 60 min. Contrariamente, cuando la temperatura era superior a 82 °C, la inactivación se incrementó drásticamente, consiguiéndose siete ciclos de reducción a 86 °C a presiones de 100-150 bar (Rao *et al.*, 2015). La temperatura de transición en *B. cereus* es 80 °C, tal y como se muestra en el capítulo 3.

Consecuentemente, la cinética de inactivación es más rápida a partir de 75-80 °C. Así, la curva de inactivación de las esporas de *B. subtilis* a 80 °C a 50 bar mostraba dos etapas distintas (Ballestra y Cuq, 1998). La velocidad de inactivación era lenta en los primeros 30 min pero luego se incrementaba rápidamente. Estos resultados se relacionaron con la activación térmica de las esporas durmientes, que es causada por un choque térmico a 70-80 °C por unos minutos. Después de esta activación, la resistencia de las esporas se pierde y son más sensibles al calor, a la presión y a los agentes químicos (MacDonnell, 2007). Así, la mayor sensibilidad al calor después de un tratamiento con COAP fue demostrada por Watanabe *et al.* (2003a). Esporas de *B. coagulans* y de *B. licheniformis* fueron sometidas a tratamiento con CO<sub>2</sub> a 35 °C y 65 bar y a continuación a tratamiento térmico (80, 85 y 90°C por 30 min). Las esporas de ambos tipos quedaron esterilizadas completamente a 90 °C y 30 min. Los autores concluyeron que eso indicaba que el COAP había sido capaz de iniciar la germinación de las esporas. Por otro lado, Rao *et al.* (2015) encontraron que la cinética de inactivación de las esporas de *B. subtilis* era mayor con la presión después de un cierto periodo de tratamiento con COAP a temperaturas superiores a los 82 °C.

El CO<sub>2</sub> tiene, a la misma temperatura de aplicación, mayor eficacia de inactivación que la aplicación de calor sin este gas. Este hecho fue inicialmente demostrado por Ballestra y Cuq, 1998 en la inactivación de esporas de *B. subtilis*. A 80°C, se obtuvieron 3,5



reducciones logarítmicas después de una hora de tratamiento con CO<sub>2</sub> a 50 bar, mientras que no hubo una reducción significativa en el recuento de estas esporas en ausencia del CO<sub>2</sub>. Similares resultados se reportaron posteriormente en *G. stearothermophilus* a 300 bar y 95°C (Watanabe *et al.*, 2003b) y en *B. subtilis* a 75 bar, tanto 60 como a 75 °C (Spilimbergo *et al.*, 2003a). Nosotros también hemos encontrado lo mismo en los tres microorganismos esporulados estudiados en este trabajo, como se discute en detalle en los capítulos 2, 3 y 5. Por ejemplo, el tratamiento con COAP a 30°C y 350 bar redujo en cuatro órdenes de magnitud las esporas de *A. acidoterrestris*, mientras que a la misma temperatura, y presión atmosférica (sin CO<sub>2</sub>), no se observó ningún efecto esporicida.

En general, el aumento del tiempo de contacto con el COAP mejora el grado de inactivación de las esporas. Las esporas de *B. cereus* fueron inactivadas a 205 bar y 60°C después de 240 min (Dillow *et al.*, 2009), mientras que las esporas de *B. megaterium* fueron inactivadas a 55 bar y 60 °C después de horas (Enomoto *et al.*, 1997). White *et al.* (2006) demostraron que si la temperatura es baja (< 50°C), y no se rebajaba el pH o se usa algún aditivo, no era posible eliminar las esporas bacterianas incluso con horas de contacto como se muestra en la Tabla 1.2.

El aumento en la presión de operación ejerce un efecto positivo en la eficacia letal del CO<sub>2</sub>. Bae *et al.* (2009) encontraron una diferencia de una reducción logarítmica en la inactivación de esporas *A. acidoterrestris* en zumo de manzana entre 80 and 120 bar a 65°C. Igualmente, el aumento de la presión de operación de 65 a 100 bar redujo en más de treinta minutos el tiempo para esterilizar esporas de *B. subtilis* a 82 °C (Rao *et al.*, 2015).

Algunos autores han relacionado el impacto del cambio de presión con el estado del CO<sub>2</sub>. Furukawa *et al.* (2003) compararon el efecto del tratamiento con CO<sub>2</sub> gaseoso presurizado (35 °C, 65 bar) respecto del tratamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico (35 °C, 300 bar) en esporas de *B. coagulans* y en *B. licheniformes*, ambos seguidos por un tratamiento térmico a 70 °C (criterio para germinación). Por un lado, encontraron que el CO<sub>2</sub> supercrítico era más eficaz que el CO<sub>2</sub> gaseoso en la inactivación de ambos tipos de esporas. Por otro lado, observaron que las esporas germinadas por el tratamiento térmico eran más sensibles al CO<sub>2</sub> supercrítico.

Sin embargo, Shimoda *et al.* (2002) demostraron que a niveles de carbonatación similares, el impacto de incrementar la presión en un amplio intervalo (40-200 bar) era nulo en la inactivación de esporas de *Aspergillus niger*. Sims *et al.* (2003) utilizando un equipo que operaba en continuo donde el COAP se ponía en contacto con el fluido en una serie de membranas de fibra hueca, encontraron similares resultados: se obtenía la misma efectividad de inactivación a 75 que a 150 bar. Justificaron sus resultados mostrando que un incremento de presión superior a 75 bar aumentaba muy poco la solubilidad del CO<sub>2</sub> en agua.

Para que la presión tuviera efecto per sé, se necesitarían elevadísimos valores. Específicamente, hay que aplicar más 8000 bar para eliminar las esporas de bacilos (Norton *et al.*, 2008). Además, Watanabe *et al.* (2003b) demostraron que el tratamiento con CO<sub>2</sub> es sustancialmente más efectivo que los procesos hidrostáticos a mucha menor presión. Sin embargo, es muy dudoso que el CO<sub>2</sub> a alta presión, incluso en estado supercrítico pueda solubilizar algún componente del exosporio de las esporas puesto que está formado por proteínas de muy baja solubilidad en este medio.

Por tanto, parece que la positiva influencia de la presión en los sistemas líquidos se debe sobre todo a la mejora en la solubilización del CO<sub>2</sub> y a la consecuente reducción del pH del medio acuoso por formación de ácido carbónico, que tiene gran importancia según se deduce de los resultados encontrados por Haas *et al.* (1989) en *Clostridium sporogenes*. Operando a 55 bar, 70 °C y 120 min, fue posible inactivar las esporas de este microorganismo, sólo cuando se redujo el pH hasta 3. Ocurrió lo mismo en nuestras investigaciones en *B. cereus* y *B. anthracis*, como se muestra en los capítulos 3 y 5 de esta tesis, respectivamente.

No obstante, se ha encontrado un efecto protector dependiente de la presión de aplicación, que se observa sobre todo en operación en discontinuo a prolongados tiempos de contacto. En el intervalo de presión entre 58 y 97 bar a 60 °C, Enomoto *et al.* (1997) observaron un óptimo en la región subcrítica del CO<sub>2</sub> (alrededor de los 60 bar) que daba un máximo en la inactivación de esporas de *Bacillus megaterium* después de 24 h de tratamiento. De hecho en estas condiciones, el grado de reducción en el recuento de estas esporas era de 6 órdenes de magnitud, mientras que a 48 o a 68 bar sólo se encontraba una reducción de 2 órdenes de magnitud. Estos interesantes resultados se asociaron a la posibilidad de que las células de las esporas formaran agregados en relación con la magnitud de la presión aplicada que impediría la acción del COAP. Esta hipótesis fue confirmada posteriormente por Furukawa *et al.* (2006) que observaron mediante microscopía de contraste de fases que las esporas de *B. coagulans* y *B. licheniformes* se agregaban en el intervalo de presión entre 65 y 300 bar; los ensayos se hicieron a 35 °C en tiempos que llegaron a los 120 min. Asimismo, Rao *et al.* (2015) observaron la formación de clústeres de esporas de *B. subtilis* mediante dispersión de luz dinámica y demostraron que el tamaño de los mismos dependía también de la

temperatura y del tiempo de operación, siendo mayor cuanto más altos eran los valores de estas variables.

Este fenómeno de agregación de las esporas se asoció a la desnaturalización de las proteínas de la corteza de las esporas, incrementando la hidrofobicidad de la superficie de las mismas (Furukawa *et al.*, 2006). Así que para romper esos clústeres y mejorar la acción esporicida del COAP, varios grupos ensayaron la adición de antiagregantes y surfactantes. Furukawa *et al.* (2006) adicionando el surfactante éster de azúcar Ryoto, P-1670 en una proporción de 0,01% g v<sup>-1</sup> consiguieron aumentar grado de inactivación de las esporas de *B. coagulans* en un 10% y de *B. licheniformes* en un 20% respecto de los mismos ensayos sin este surfactante. De igual manera, Rao *et al.* (2015) mostraron, mediante dispersión de luz dinámica, que adicionando 0,1% de Tween 80 era posible inhibir la formación clústeres de esporas y consecuentemente, el grado de inactivación en las mismas condiciones de operación era hasta un orden de magnitud mayor en las suspensiones de *B. subtilis* conteniendo Tween 80.

Con el fin de inducir la germinación de las esporas para hacerlas más sensibles al COAP, Spilimbergo *et al.* (2002) variaron la presión cíclicamente durante el tratamiento. El objetivo era causar un cambio súbito en las condiciones ambientales para alterar el balance del sistema biológico latente y lo suficientemente rápido para no permitirles restaurar su estado latente antes del siguiente ciclo. En 20 min de tiempo de tratamiento total y partiendo de 150 bar redujeron la presión hasta 10 veces en un intervalo de 100 bar. Los resultados fueron positivos con un incremento de tres órdenes de magnitud en la inactivación de esporas de *B. subtilis*.

Tanto las condiciones de operación como el tiempo necesario de contacto, se redujeron mucho si el CO<sub>2</sub> se introducía en microburbujas, que se consiguen haciendo pasar el CO<sub>2</sub> por un filtro de menos de 120 µm (Osajima *et al.*, 1997). Esta forma de entrada del CO<sub>2</sub> aumenta en gran medida el grado de carbonatación del medio. Por ejemplo, se puede incrementar la concentración de CO<sub>2</sub> de 0.4 a 0.92 mol L<sup>-1</sup> a 250 bar y 35°C (Ishikawa *et al.*, 1995). Consecuentemente, se mejora la eficacia del tratamiento. Mientras que a 300 bar, se llega a 2 ciclos de reducción en esporas de *B. cereus* operando a 60 °C y 45 min (Casas y Calvo, 2013), en las mismas condiciones, pero introduciendo el CO<sub>2</sub> en microburbujas, se consigue un grado de inactivación de seis ciclos en tan sólo 30 min (Ishikawa *et al.*, 1997).

De la misma forma, la operación con paso continuo de CO<sub>2</sub> sobre la muestra (indicado en la Tabla 1.2. como semicontinuo) o la operación en continuo con las corrientes líquida y de COAP fluyendo en paralelo a través de un recipiente tubular, reduce el tiempo necesario para la inactivación respecto de la operación en discontinuo, porque mejora el contacto y la turbulencia. La inactivación total de *A. acidoterrestris* se consiguió con un tiempo de contacto de 5 min en continuo (y a tan sólo 45° C) en zumo de naranja (Bae *et al.*, 2009) mientras que en discontinuo fueron necesarios 45 min a 65 °C en zumo de manzana (Sims *et al.*, 2003). Otros resultados similares para *B. cereus* y para *B. anthracis* se muestran en los capítulos 3 y 5 de esta tesis.

La incorporación del etanol al CO<sub>2</sub> se investigó en la inactivación de esporas de hongos: *Alternaria brassicicola* (Park *et al.*, 2012b) y *Penicillium oxalicum* (Park *et al.*, 2013a). La conclusión de estos trabajos es que el sistema CO<sub>2</sub>-etanol reduce el tiempo de tratamiento a la mitad para la inactivación de esporas de hongos, en comparación con el

CO<sub>2</sub> solo. El etanol se mezcla totalmente con el CO<sub>2</sub> y es un agente bactericida, ello podría explicar los resultados positivos obtenidos con este frecuente modificador.

Un curioso documento del Centro Natick de la Armada de los Estados Unidos de 1995, describe el uso de Lisozima como aditivo que causa un efecto sinérgico con el COAP. La presencia de 300 ppm de lisozima en un cultivo de *G. stearothermophilus* junto con la aplicación de CO<sub>2</sub> a 13,8 bar redujo la viabilidad de las esporas hasta menos de 1 unidad formadora de colonia por mL, en menos de 2 h a tan sólo 37 °C (Sikes y Martin, 1995). La enzima lisozima puede degradar el cortex de la mayoría de las esporas facilitando así la germinación de la espora (Setlow, 2003) que sería más sensible al ataque del CO<sub>2</sub> presurizado.

Otra opción que se ha probado en la eliminación de esporas a baja temperatura es la combinación de COAP con campos de pulsos eléctricos. Mediante un tratamiento inicial de campos de pulsos eléctricos (hasta 25 kV cm<sup>-1</sup>) seguido de un tratamiento con COAP a 200 bar y 40 °C, fue posible alcanzar una reducción de tres órdenes de magnitud en el recuento de esporas de *B. cereus*, siendo mayor la inactivación cuanto más prolongado era el contacto con COAP (Spilimbergo *et al.*, 2003b).

### **1.7.2. Impacto del medio en la inactivación de esporas con COAP**

Existen factores que podrían dificultar la desactivación de las esporas cuando están presentes en alimentos o biomateriales. Las matrices complejas son ambientes protectores que dificultan la desactivación (García-González *et al.*, 2007). En el capítulo 3 de esta tesis se muestra que la presencia de grasas dificultó la inactivación de

*B. cereus* tanto en medio líquido como sólido (Casas y Calvo, 2013). Dos posibles razones podrían explicar este resultado. Bien la grasa actuó como una capa protectora impidiendo el contacto con el COAP, bien la fracción lipídica pudo haber tamponado la reducción del pH, que como se ha mencionado anteriormente, tiene un impacto muy positivo en la actividad esporicida del COAP.

Más aún, Furukawa *et al.* (2009) estudiando la influencia de la presencia de sales y azúcares en la desactivación de esporas de *Geobacillus stearothermophilus*, mostraron que ambas sustancias ejercían un efecto protector en proporción con su concentración porque rebajan la actividad de agua y actúan como nutrientes. Ello explicaría, junto con la baja temperatura de la operación, que no se encontrara ninguna desactivación de esporas de *B. cereus* en leche cruda operando a 483 bar y 40 °C en un sistema en continuo con un tiempo de residencia de 10 min (ver Tabla 1.2.) (Werner *et al.*, 2006).

Por otro lado, como se mostrará en detalle en el capítulo 2 de esta tesis, se ha comprobado que la inactivación *A. acidoterrestris* en crema de manzana fue menor que en zumo. Ello es debido a que la crema de manzana es mucho más viscosa que el zumo y esto resultó en un menor nivel de contacto efectivo con el COAP.

No obstante, el factor más importante de las matrices naturales a la hora de la esterilización con COAP es el grado de humedad, como se discute a continuación en el caso de alimentos sólidos.

### 1.7.3. Inactivación de esporas en alimentos sólidos mediante COAP

Hay muy poco trabajo realizado sobre la inactivación de esporas en alimentos sólidos. Un resumen se muestra en la Tabla 1.3. Los alimentos sólidos están generalmente deshidratados y provienen del campo directamente por lo que la contaminación microbiana que tienen es alta y en un porcentaje elevado se corresponde con esporas de *bacillus*. Concretamente en el polvo de cacao o de pimentón, la contaminación por esporas aerobias mesófilas alcanzó un 50% del recuento total aerobio. Aunque no está reportado en los otros cuatro alimentos mostrados, es altamente probable que la biocontaminación sea también en una gran proporción debida a esporas, por ello se ha incluido.

El problema de la desactivación de esporas en alimentos sólidos es la baja actividad de agua. Kamihira *et al.* (1986) mostraron que el CO<sub>2</sub> puro no era efectivo en la eliminación de esporas secas. Consecuentemente, humedecer el sólido favoreció la inactivación de la microbiota natural esporulada como se muestra tanto en el caso del pimentón como del cacao. En el cacao, con la humedad natural (8% en masa), el recuento total de aerobios mesófilos después de un tratamiento a 300 bar, 60 °C por 20 min fue prácticamente igual al inicial, mientras que cuando al cacao se le humedeció al 18%, se consiguió una reducción de 4,7 ciclos logarítmicos en las mismas condiciones, que supuso en la práctica, la esterilización del producto.



**Tabla 1.3.** Grado de inactivación de la microbiota natural en varios alimentos sólidos mediante el uso de COAP en distintas condiciones y utilizando ocasionalmente agua y otros aditivos.

Microorganismo	Presión	Temperatura	Tiempo	Aditivos	Cantidad	Alimento (proporción en masa de agua)	Forma de operación	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
	(bar)	(°C)	(min)						
40 Recuento total aerobio (50% esporas)	60	80	45			Pimentón (8%)		-0,1	
	60	60	30			Pimentón humedecido (28%)		-1,5	
	60	80	45			Pimentón humedecido (28%)	Semicontinuo	-1,6	Calvo y Torres, 2010
	300	80	150			Pimentón humedecido (28%)		-2,7	
	300	90	45			Pimentón humedecido (28%)		-5,0	
Recuento total aerobio (50 % esporas)	100	80	30			Pimentón (9%)		-0,4	
	100	80	30	Aceite esencial de orégano	2,6 % con respecto de la masa de pimentón	Pimentón humedecido (25%)	Semicontinuo	-1,8	Casas <i>et al.</i> , 2016
	100	80	30			Pimentón humedecido (35%)		-2,4	

Microorganismo	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Aditivos	Cantidad	Alimento (proporción en masa de agua)	Forma de operación	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
Recuento total aerobio (50% esporas mesofilicas aerobias)	300	65	20			Polvo de cacao (8%) Polvo de	Semicontinuo	-0,0	Calvo <i>et al.</i> , 2007
	300	65	20			cacao humedecido (18%)		-4,1 (Total)	
	300	40	120	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Polvo de cacao (8%)		-0,0	
	300	40	120	Etanol		Polvo de cacao (8%)		-0,0	
Recuento total aerobio	150	60	900	-	-		Discontinuo	-2,7	Dehghani <i>et al.</i> , 2009
	100	60	60	H <sub>2</sub> O	0,4 (mL/g)			-0,1	
	100	60	60	Etanol	0,4 (mL/g)			-0,1	
	100	60	60	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,4 (mL/g)			-0,4	
	100	60	60	H <sub>2</sub> O / Etanol / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,02:0,02:0,02 (mL/g)	Polvo de ginseng		-1,8	
	170	30	120	H <sub>2</sub> O / Etanol / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,02:0,02:0,02 (mL/g)			-4,3	
	170	30	120	H <sub>2</sub> O / Etanol / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,1:0,1:0,1(mL/g)			-7,0 (Total)	
Recuento total aerobio	250	50	60	-	-	Semillas de alfalfa	Discontinuo		Mazzoni <i>et al.</i> , 2001

Microorganismo	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Aditivos	Cantidad	Alimento (proporción en masa de agua)	Forma de operación	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
Esporas de <i>G. stearothermophilus</i>	99	35	30	Ácido peracético	100 ppm	Queso tipo Mozzarella	Discontinuo	-1,4	Sikin <i>et al.</i> , 2016
ESPORAS DE HONGOS									
<i>Aspergillus niger</i>	300	80	30			Polvo de cacao humedecido (13%)	Semicontinuo	-5,4 (Total)	Calvo <i>et al.</i> , 2007
<i>Aspergillus ochraceus</i>	300	80	30				Semicontinuo	-3,4 (Total)	
<i>Penicillum oxalicum</i>	100	40-45	20-30			Granos de trigo		-1,9 -2,7	
							Discontinuo		
	100	40-50	10-30	H <sub>2</sub> O	0,15-0,3 (mL/3 g granos)			-4,3 -6,0	Park <i>et al.</i> , 2012a
	100	40-45	20-30					-2,9 -3,9	
						Semillas de cebada	Discontinuo		
	100	40-50	10-30	H <sub>2</sub> O	0,15-0,3 (mL/3 g semillas)			-4,3 -6,0	

Similares resultados se obtuvieron en la inactivación de esporas de hongos, específicamente de *Penicillium oxalicum*, en granos de trigo (Park *et al.*, 2012a) y en semillas de cebada (Park *et al.*, 2013a). En estos dos ejemplos, un diseño de experimentos con la temperatura, el tiempo de tratamiento y el contenido en agua, demostró que este último factor era el más significativo. Concretamente, en el trabajo realizado en semillas de cebada, cuando la presión se fijó en 100 bar, en las condiciones óptimas de 44 °C, 12 min de tiempo de tratamiento y cantidad de agua adicionada de 231 µl, se obtuvo una reducción de 6,8 logaritmos en el recuento de las esporas de hongos.

Por otro lado, al comparar el efecto de la humedad inicial del pimentón en el tratamiento con COAP y en el tratamiento con calor sólo, se observó que no había prácticamente diferencias (Calvo y Torres, 2010). Este hecho indica que la influencia del contenido en agua es similar en ambos casos. En la esterilización con calor, la inactivación de las esporas se asocia a procesos oxidativos en los que el nivel de agua del ambiente juega un importante papel (McDonal, 2007).

Igual que en fase líquida, el aumento de la temperatura mejora la inactivación de las esporas contaminantes de alimentos y genera dos tramos en la evolución del grado de inactivación, uno antes de los 75-80 °C donde la letalidad del CO<sub>2</sub> es menor y otro a continuación donde la inactivación es mayor (Calvo y Torres, 2010, Casas *et al.*, 2012 y Haas *et al.*, 1989). Tomando como ejemplo la inactivación de la microbiota natural del pimentón, se observa además que la curva de inactivación con calor tiene la misma forma, excepto que en el segundo periodo de dependencia con la temperatura (a mayores temperaturas que 80 °C), la inactivación con COAP procede ligeramente más deprisa

con la temperatura. A 85 °C, hay un logaritmo de diferencia en la reducción microbiana total entre los dos tratamientos. Ello indica, que también en sólidos, una vez que las esporas son térmicamente activadas, son más sensibles al efecto del COAP que es capaz de un efecto esporicida separado y mayor.

La eficacia esporicida del COAP en sólidos aumenta con el tiempo de tratamiento. La dependencia es lineal, tal y como se ha demostrado en la inactivación de la microbiota natural de pimentón (Calvo y Torres, 2010), indicando por tanto que la cinética de inactivación es de orden uno ( $\ln N = \ln N_0 - kt$ ). Sin embargo, la dependencia es suave. Para la reducción de un orden de magnitud en el recuento total de microorganismos aerobios en pimentón, fue necesario incrementar el tratamiento casi dos horas. Sin embargo, el tiempo de operación está limitado por la preservación de la calidad del producto alimentario como se discutirá más adelante en la sección 1.7.5. y por la viabilidad industrial del método.

La presión no tiene mucha relevancia en la inactivación de esporas con COAP en alimentos de baja actividad de agua. Este hecho se comprobó en la inactivación de la microbiota natural esporulada del pimentón (Calvo y Torres, 2010), de esporas de *A. acidoterrestris* en crema de manzana (Casas *et al.*, 2012) y del hongo *Penicillium oxalicum* en granos de trigo o semillas de cebada (Park *et al.*, 2012a). Como se ha discutido anteriormente, la presión sobre todo ayuda a la disolución del CO<sub>2</sub> en productos líquidos y a la consiguiente reducción de pH, beneficios que no son posibles en ambientes deshidratados. Por ello, tampoco fueron efectivos los ciclos de presión en la inactivación de la microbiota del pimentón (Calvo y Torres, 2010).

Dada la mayor dificultad que tiene la inactivación de esporas en alimentos sólidos secos para obtener la reducción en el recuento aerobio total que exige la legislación sin aumentar excesivamente la temperatura, y la escasa influencia del tiempo de tratamiento o de la presión, varios autores probaron la utilización de aditivos. Naturalmente el agua es el primero que se ensayó dado su carácter inocuo. En la eliminación de esporas de hongos sobre granos de trigo y semillas de cebada fue suficiente, pero en la microbiota natural de ginseng sólo se logró una reducción de 0,1 reducciones logarítmicas cuando se añadió 0,4 ml g<sup>-1</sup> de agua operando a 100 bar, 60 °C y 1 hora. Por ello, estos autores probaron otros modificadores: etanol y peróxido de hidrógeno, así como mezclas de ellos. La mejor combinación fue de agua/etanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Con proporciones iguales de 0,1 ml g<sup>-1</sup> lograron la esterilización del producto (Dehghani *et al.*, 2008). Por el contrario, no se obtuvieron buenos resultados en la reducción de la biocontaminación de cacao, ni con etanol, ni con peróxido de hidrógeno (Calvo y Torres, 2010).

Tampoco se obtuvo la reducción deseada de esporas de *Geobacillus stearothermophilus* (solo 1,4 log<sub>10</sub>) que contaminaban queso tipo Mozzarella al emplear ácido peracético como aditivo (100 ppm) del CO<sub>2</sub> aplicado a 99 bar y 35 °C (Sikin *et al.*, 2016).

En cualquier caso, estos aditivos no parecen ser los más adecuados cuando se trata con alimentos, y están muy limitados en su concentración, por eso en esta Tesis, se ha investigado el uso de aceites esenciales. Sus propiedades antimicrobianas están ampliamente investigadas, son productos naturales, organolépticamente más adecuados y aptos para su introducción en alimentos en concentraciones mayores (Burt, 2004, Seow *et al.*, 2014 y Tajkarimi *et al.*, 2010). Después del tratamiento, pueden eliminarse disueltos en el CO<sub>2</sub>.

Como se muestra en el capítulo 4 de este documento, con aceite esencial de orégano mezclado con el CO<sub>2</sub> a 100 bar y 80 °C se consiguió incrementar la inactivación microbiana del pimentón en un 99,5%.

#### **1.7.4. Inactivación de esporas en materiales sensibles mediante COAP**

La Tabla 1.4. muestra el trabajo realizado en la eliminación de esporas en sólidos no alimentarios. Algunos de estos estudios se han hecho sobre tiras de papel comerciales de las esporas que se venden como bioindicadores, los otros se han realizado sobre material médico, electrónico, óptico, medicamentos, biomateriales o metales (monedas, partes de vehículos, etc.).

La dificultad de esterilización en estos materiales reside en que la mayoría son termosensibles, especialmente los biomateriales y fármacos, por lo que no es posible elevar la temperatura por encima de los 40 °C. Sin embargo, igual que ocurría en alimentos, las esporas no son inactivadas a menos de 80 °C aprox. y requieren tiempos prolongados. No hay más que repasar los datos mostrados en los trabajos hechos en las tiras comerciales de *B. atrophaeus* y de *G. stearothermophilus* (White *et al.*, 2006), o en hidrogeles de PEG, en los que no se consigue inactivar las esporas de *B. atrophaeus* inoculadas, hasta no alcanzar los 70 °C a 150 bar y operar por 4 horas (Karajanagi *et al.*, 2011). Hay que tener en cuenta que este material tiene un 90 % de agua que, por los resultados mostrados en alimentos sólidos, debería facilitar la inactivación de esporas.

**Tabla 1.4.** Grado de inactivación de esporas bioindicadoras obtenido mediante tratamiento con COAP y distintos aditivos cuando contaminaban materiales biomédicos y sensibles.

Microorganismo	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Aditivo	Concentración	Sustrato	Forma de operación	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
47 Microbiota natural	200	35	120	Etanol	2,3%	Plasma en polvo con un contenido en agua del 6,8 %	Discontinuo	0,0	Kamihira <i>Et al.</i> , 1987
	200	35	120	Ácido acético	0,7%		Discontinuo	-0,7	
	200	35	120	Etanol	1,9%	Plasma en polvo con un contenido en agua del 17 %	Discontinuo	-1,2	
	200	35	120	Ácido acético	0,4%		Discontinuo	-4,4	
<i>B. anthracis</i>	275	40	240	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200 ppm	Viales	Discontinuo	-6,1	Zhang <i>et al.</i> , 2007
<i>B.atrophaeus (B. subtilis)</i>	100	60	4320			Tiras bioindicadoras	Discontinuo (con ciclos de presión)	0,0	White <i>et al.</i> , 2006



48

Microorganismo	Presión	Temperatura	Tiempo	Aditivo	Concentración	Sustrato	Forma de operación	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
	(bar)	(°C)	(min)						
<i>B.atrophaeus (B. subtilis)</i>	250	40	60					0,0	
	200	60	240					-1,0	
	150	70	60			Hidrogeles PEG (90% agua)	Discontinuo	-2,0	Karajanagi <i>et al.</i> , 2011
	75	70	240					-5,0	
	150	70	240					-7,0	
	50	80	60					-7,0	
	200	55	300	H <sub>2</sub> O	50%	Corticosteroides en polvo	Discontinuo	-0,8	Zani <i>et al.</i> , 2013

Microorganismo	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Aditivo	Concentración	Sustrato	Forma de operación	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
<i>B.atrophaeus (B. subtilis)</i>	200	35	240		2-10 %	Células secas		0,0	
	200	35	240	H <sub>2</sub> O	70-90 %	Células húmedas		-0,3	
	200	35	240	Etanol	2%	Células secas	Discontinuo	-0,2	Kamihira <i>et al.</i> , 1987
	200	35	240	Etanol	2%	Células húmedas		-0,3	
	200	35	240	Ácido acético	0,5%	Células secas		-0,4	
	200	35	240	Ácido acético	0,5%	Células húmedas		-0,4	
	-----								
	300	95	25	H <sub>2</sub> O	13 %	Tiras bioindicadoras	Semicontinuo	-6,0	Hemmer <i>et al.</i> , 2007
	300	40	60	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 ppm		Semicontinuo	-6,0	

Microorganismo	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Aditivo	Concentración	Sustrato	Forma de operación	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
<i>B.atrophaeus (B. subtilis)</i>	170	37	120				Discontinuo	-1,8	
	170	37	120	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O + Etanol	625 ppm de cada uno	Polietileno de ultra alto peso molecular	Discontinuo	-6,0	Ellis <i>et al.</i> , 2010
	170	37	120	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1250 ppm		Discontinuo	-6,0	
	205	35	240	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	300 ppm	Esponjas y películas de colágeno	Discontinuo con seis ciclos de presión hasta 80 bar	-6,0	Herdegen <i>et al.</i> , 2014
	85	38	30	0,25% agua/0,15 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /0,5% anhídrido acético		Cilindros de alginato/agarosa y estructuras tridimensionales de colágeno	Discontinuo	-8,8	Bernhardt <i>et al.</i> , 2015

Microorganismo	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Aditivo	Concentración	Sustrato	Forma de operación	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
<i>B.atrophaeus (B. subtilis)</i>	300	60	180				Discontinuo	-0,5	
	300	60	120	Etanol	10%	Cupones de acero inoxidable	Discontinuo con cuatro ciclos de presión	-2,3	Silva <i>et al.</i> , 2016
	300	60	180	Nisina	100 litros al 0,2%			> -7,0 (total)	
	100	41	30	Ácido peracético	55 ppm	Matriz acelular dérmica	Discontinuo con agitación	-6,0	Qiu <i>et al.</i> , 2009
	99	35		15,5 % ácido peracético + 6% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	800 ppm	Tejidos de implantes de huesos y tendones	Discontinuo con agitación	-6,0	Nichols <i>et al.</i> , 2009
	99	35	120+120	15,5 % ácido peracético + 6% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 ppm	Matrices pulmonares acelulares	Discontinuo con agitación	-6,0	Balestrini <i>et al.</i> , 2016

Microorganismo	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Aditivo	Concentración	Sustrato	Forma de operación	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
<i>B.cereus</i>	300	35	120					-0,5	
	100	60	120			Biofilms sobre piezas de acero inoxidable	Discontinuo	-0,5	Park <i>et al.</i> , 2013b
	100	60	60	Etanol	3 %			-4,5 (total)	
	85	38	45	0,25% agua/0,15 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /0,5% anhídrido acético		Cilindros de alginato/agarosa y estructuras tridimensionales de colágeno	Discontinuo	-6,5	Bernhardt <i>et al.</i> , 2015
<i>B. pumilus</i>	275	60	240	Agua	10%			-3,0	
	275	40	240	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200 ppm	Tiras bioindicadoras	Discontinuo	-4,7	Zhang <i>et al.</i> , 2006
	275	60	240	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200 ppm			-6,3	
	275	60	240			Discontinuo		-3,0	Zhang <i>et al.</i> , 2005

Microorganismo	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Aditivo	Concentración	Sustrato	Forma de operación	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
<i>B. pumilus</i>	275	60	240	CO <sub>2</sub> + 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Discontinuo		-6,0	Zhang <i>et al.</i> , 2005
	80	50	30	H <sub>2</sub> O conteniendo 0,1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,3%	Placa de microscopio/ Tiras bioindicadoras comerciales	Discontinuo	-7,0 (Total)	Checinska <i>et al.</i> , 2011
	100	50	45	H <sub>2</sub> O conteniendo 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,3%		Discontinuo	-5,0 (Total)	
	100	50	45	H <sub>2</sub> O mezclado with 10% metanol conteniendo 0,5% ácido fórmico	3,3%	Moneda/cupones metálicos/Memoria USB/ chips	Discontinuo	-5,0 (Total)	Shieh <i>et al.</i> , 2009
	100	50	45	Metanol conteniendo 12% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10%		Discontinuo	-5,0 (Total)	
	85	38	45	0,25% agua/0,15 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /0.5% anhídrido acético		Cilindros de alginato/agarosa y estructuras tridimensionales de colágeno	Discontinuo	-4,0	Bernhardt <i>et al.</i> , 2015

Microorganismo	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Aditivo	Concentración	Sustrato	Forma de operación	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
<i>G. stearothermophilus</i>	200	35	240		2-10 %	Células secas	Discontinuo	0,0	Kamihira <i>et al.</i> , 1987
	200	35	240	H <sub>2</sub> O	70-90 %	Células húmedas	Discontinuo	-0,1	
	300	105	25	H <sub>2</sub> O	2,2 %	Tiras bioindicadoras	Semicontinuo	-6,0	Hemmer <i>et al.</i> , 2007
	300	40	60	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 ppm		Semicontinuo	-6,0	
	50	65	120	O <sub>3</sub>	< 1 %	Tejidos de vestuario médico y polímeros para implantes	Discontinuo	-6,0 (Total)	Cinqueman <i>et al.</i> , 2007
	270	40	90		200 ppm			-6,0	
	270	40	60	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	400 ppm	Materiales termoset y sus superficies bioactivas	Discontinuo	-6,0	Donati <i>et al.</i> , 2012
270	40	30	600 ppm		-6,0				
160	40	120	600 ppm		-6,0				

Microorganismo	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Aditivo	Concentración	Sustrato	Forma de operación	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
G. <i>stearothermophilus</i>	85	38	45	0,25% agua/0,15% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /0,5% anhídrido acético		Cilindros de alginato/agarosa y estructuras tridimensionales de colágeno	Discontinuo	-6,0	Bernhardt <i>et al.</i> , 2015
	270	40	90	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200 ppm	Tiras bioindicadoras	Discontinuo	-6,0	Donati <i>et al.</i> , 2012
	100	60	72x60				Discontinuo (con ciclos de presión)	0,0	
						Tiras bioindicadoras			White <i>et al.</i> , 2006
	100	60	60	Ácido peracético/fluoroacético	5 %		Discontinuo	-6,4	
	300	60	180				Discontinuo	-0,4	
	300	60	180	Etanol	10%	Cupones de acero inoxidable	Discontinuo con cuatro ciclos de presión	-1,4	da Silva <i>et al.</i> , 2016
	300	60	180	Nisina	100 ppm al 3%			> -5,0 (total)	



56

Microorganismo	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Aditivo	Concentración	Sustrato	Forma de operación	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
<i>Streptomyces coelicor</i>	300	40	360			Estructuras porosas de ácido poli-L- láctico	Discontinuo	-10,0	Lanzalaco <i>et al.</i> , 2016
	300	30	360	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200 ppm	Estructuras porosas de ácido poli-L- láctico	Discontinuo	-11,0	
<i>Clostridium sporogenes</i>	99	35	20	Ácido peracético	50 ppm	Tejido de membrana amniótico	Discontinuo	-6,0	Wehmeyer <i>et al.</i> , 2015
ESPORAS DE HONGOS									
				Agua	2-10 %			-0,1	
				Agua	70-90 %			-5,1	
<i>Aspergillus niger</i>	200	35	120	Etanol	2%		Discontinuo	-6,4	Kamihira <i>et al.</i> , 1987
				Ácido acético	0,50%			-6,9	

Microorganismo	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Aditivo	Concentración	Sustrato	Forma de operación	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	50	30	H <sub>2</sub> O conteniendo 0,1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,3%	Placa de microscopio	Discontinuo	-8,0 (Total)	Checinska <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus nidulans</i>	100	50	30	H <sub>2</sub> O conteniendo 0,1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,3%	Placa de microscopio	Discontinuo	-8,0 (Total)	
<i>Candida albicans</i>	100	40	5			Biofilms sobre piezas de acero inoxidable	Discontinuo	-7,0 (Total)	Park <i>et al.</i> , 2015
<i>Conidia-esporas T</i>	85	38	45	0,25% agua/0,15% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /0,5% anhídrido acético		Cilindros de alginato/agarosa y estructuras tridimensionales de colágeno	Discontinuo con agitación	-6,5	Bernhardt <i>et al.</i> , 2015
<i>Conidia-esporas A. brasiliensis</i>	85	38	45	0,25% agua/0,15% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /0,5% anhídrido acético		Cilindros de alginato/agarosa y estructuras tridimensionales de colágeno	Discontinuo con agitación	-6,5	Bernhardt <i>et al.</i> , 2015

Sin embargo, añadiendo agua en pequeñas cantidades y operando a bajas temperaturas, no se consigue el grado de esterilidad exigido para estos materiales. Así ocurrió en el intento de inactivar de *B. subtilis* en corticosteroides en polvo, en los que incluso añadiendo un 50% en peso de agua y operando a 55 °C, no se consiguió ni una reducción logarítmica (Zani *et al.*, 2013). Bien es cierto, que la presencia de agua (0,4%) en biofilms de esporas del hongo *Candida albicans*, mejoró su sensibilidad a la inactivación por COAP, que se logró en 5 min a 100 bar y 40 °C.

Para esporas de *bacillus* se obtuvieron mejores resultados empleando 3,3 % de agua modificada con pequeñas cantidades de peróxido de hidrógeno en la eliminación de *B. pumilus* sobre placas de microscopio a 30 °C (Checinska *et al.*, 2011) y sobre superficies metálicas y dispositivos electrónicos a 45 °C (Shieh *et al.*, 2009). En estos últimos dispositivos, también probó ser efectivo el uso de agua mezclado con 10% de metanol conteniendo 0,5% de ácido fórmico.

Pero en muchos materiales, no es posible añadir agua porque son hidrolíticos o pierden sus propiedades. Consecuentemente, para la esterilización de estos productos se ha explorado el uso de ciclos de presión y de aditivos. Sin embargo, White *et al.* (2006) comprobaron que más de 30 ciclos de presión entre 207 y 345 bar en un periodo de dos horas no fueron efectivos en la inactivación de preparados de esporas de *B. subtilis* y *G. stearothermophilus*. La misma ineficacia de la aplicación de ciclos de presión fue posteriormente comprobada en estos organismos inoculados en superficies metálicas (da Silva *et al.*, 2016). Esta forma de proceder, supondría además un importante estrés mecánico en los equipos.

Los mejores resultados en la esterilización de biomateriales se han obtenido mediante la adición al CO<sub>2</sub> de pequeñas cantidades de compuestos que se utilizan comúnmente como bactericidas o esporicidas en laboratorios y en el ámbito sanitario, incluyendo ácidos, alcoholes y agentes oxidantes. Concretamente, en la Tabla 1.4. se muestra que los aditivos más utilizados han sido el etanol, el peróxido de hidrógeno y los ácidos orgánicos.

Con relativamente elevadas cantidades de etanol (3% en volumen) y aumentando la temperatura a 60 °C, Park *et al.* (2013b) consiguieron inactivar esporas de *B. cereus* dentro de biofilms crecidos sobre acero inoxidable, a 100 bar en un tratamiento de 60 min. A la misma temperatura y con un 10% de etanol en el CO<sub>2</sub>, sólo se inactivaron 2,3 log<sub>10</sub> de las esporas de *B. atrophaeus* en cupones metálicos, incluso después de 180 min a 300 bar (da Silva *et al.*, 2016).

A temperaturas más bajas y con menores cantidades, los aditivos más eficaces fueron los agentes fuertemente oxidantes. El grupo del profesor Matthews investigó el uso de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en varios tipos de esporas. Cuando al CO<sub>2</sub> se le añadió 200 ppm de peróxido de hidrógeno, operando a 275 bar, 40 °C por 240 min, aumentó de tres a seis (esterilización) reducciones logarítmicas la inactivación de *B. pumilus* (Zhang *et al.*, 2006). Posteriormente y en similares condiciones, también demostró que era posible la desactivación total de *Bacillus atrophaeus* (Zhang *et al.*, 2006), *Bacillus anthracis* (Zhang *et al.*, 2007) y *Geobacillus stearothermophilus* (Hemmer *et al.*, 2006).

En una aplicación de esta mezcla, se investigó la esterilización de biomateriales con superficies bioactivas utilizando tiras de *G. stearothermophilus*. Se consiguió con 200 ppm de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a 40 °C, 270 bar y 90 min de tratamiento. Aumentando la concentración a 600 ppm se pudo rebajar el tiempo de tratamiento a 30 min (Donati *et al.*, 2012). A similares condiciones, se consiguió también la inactivación de *B. anthracis*, conocido comúnmente como Ántrax (Zhang *et al.*, 2007) y de esporas de *Streptomyces coelicolor* en estructuras biodegradables de ácido poli(L-láctico) (Lanzalaco *et al.*, 2016).

Utilizando como aditivos del CO<sub>2</sub>, mezclas de agua, peróxido de hidrógeno y otros compuestos, también hay descritos casos de esterilización de materiales termosensibles. Así, se consiguió la inactivación de todos los microorganismos inoculados a polietileno de ultra alto peso molecular en 2 h a 37 °C y 170 bar, cuando se mezcló el CO<sub>2</sub> con al menos el mismo volumen de peróxido de hidrógeno (fracción molar de  $4.2 \cdot 10^{-4}$ ) que de otros modificadores (etanol y agua) (Ellis *et al.*, 2010). Por otro lado, se consiguió la esterilización de estructuras tridimensionales cilindros de alginato/agarosa y estructuras tridimensionales de colágeno (simulando partes de tendones y piel) con una mezcla que incluía 0.25% de agua, 0.15 % de peróxido de hidrógeno y 0.5 % de anhídrido acético (Bernhardt *et al.*, 2015).

En otro trabajo se mostró la eficacia del COAP mezclado con ozono para la inactivación de patógenos en biopolímeros médicos. Para la completa inactivación de esporas de *G. stearothermophilus* fue necesaria la producción in situ y adición de

pequeñas cantidades de ozono ( $<<1\% \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). La presión efectiva de esterilización fue de 75 bar operando a 20 °C y 60 min (Cinquemani *et al.*, 2007).

La mayor efectividad del ácido peracético entre una gran lista de aditivos para el COAP la demostró por primera vez la empresa Nova Sterilis Inc. en un trabajo publicado en 2006 (White *et al.*, 2006).

La selección se hizo en función de la efectividad de inactivación de esporas de *G. stearothermophilus* después de haber comprobado que la adición de agua para humidificar el interior del recipiente fuera inefectiva en la inactivación de preparados secos comerciales de estas esporas y de *B. subtilis*. De los aditivos seleccionados entre diversos ácidos orgánicos, etanol y peróxido de hidrógeno, el ácido trifluoroacético (ATF) y el ácido peracético (APA) resultaron en una reducción de más de seis ciclos logarítmicos en las esporas.

La selección se hizo a 103 bar y 50-60 °C utilizando en el caso de estos ácidos más eficaces, una hora de operación. El APA en disolución acuosa espontáneamente alcanza el equilibrio conteniendo ácido acético y peróxido de hidrógeno. Sin embargo, en este trabajo se demostró también que la especie activa para la inactivación de las esporas es propiamente el APA. Comparando los resultados con mezclas de este ácido y aire, los autores concluyeron que existía un sinergismo significativo entre el APA y el COAP para la inactivación de endoesporas.

La empresa Nova Sterilis Inc. tiene vigente la patente en la que se sustenta esta investigación (Christensen, 2005) y otras tantas patentes posteriores en diversas

aplicaciones concretas ( Novasterilis, 2017 a). Comercializa los equipos necesarios para realizarlas en recipientes de volúmenes de 20 y 80 litros y los aditivos, que contienen APA y/o sus mezclas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para usar en concentraciones de 25 a 100 ppm respecto del COAP.

En su web (Novasterilis, 2017 b ) se reportan exitosos casos de aplicación operando a 35-40 °C y 100 bar, en matrices acelulares dérmicas (Qiu *et al.*, 2009) y pulmonares (Balestrini *et al.*, 2016), aloinjertos de huesos (Russell *et al.*, 2013a) y de menisco (Bui *et al.*, 2014), tendones y huesos (Nichols *et al.*, 2009), membranas amnióticas (Wehmeyer *et al.*, 2015), ...

Recientemente, se ha demostrado también la capacidad esporicida de las mezclas CO<sub>2</sub>-nisina en esporas de *B. Subtilis* y *G. stearothermophilus* que contaminaban superficies metálicas. La nisina es un biocida producido por ciertas cepas de *Lactococcus lactis*, capaz de inhibir el crecimiento de esporas de *Clostridium* y *Bacillus* por lo que se utiliza como conservante alimentario (McDonell, 2007). A 300 bar y 60 °C, la adición de 100 µL de una solución de nisina al 0.5% fue capaz de inactivar las esporas de *B. cereus*, y con una concentración mayor (3%), las de *G. stearothermophilus*.

Nosotros hemos patentado un método para la esterilización de materiales utilizando CO<sub>2</sub> saturado en agua ligeramente acidificada, como se explica en el capítulo 5 de esta Tesis. Dado que el agua se introduce en cantidades muy pequeñas y de forma continua, es aplicable incluso en materiales ópticos y electrónicos.

### 1.7.5. Efecto del tratamiento con COAP en la calidad de los alimentos

La viabilidad de la esterilización mediante COAP depende finalmente del efecto que el CO<sub>2</sub> cause en el producto tratado. Concretamente, los alimentos procesados utilizando COAP podrían sufrir acidificación, extracción de compuestos solubles, u otros efectos adversos en sus propiedades nutricionales y organolépticas.

Si el tratamiento con COAP se lleva a cabo junto con aditivos, también hay que tener en cuenta la posibilidad de que los aditivos causen algún impacto negativo, por ejemplo el peróxido de hidrógeno, el ácido peracético y el ozono son potentes oxidantes. El etanol, la lisozima, la nisina, los ácidos esenciales, los ácidos orgánicos, etc. son aceptados en consumo alimentario, pero su concentración residual en el producto está legislada y debe ser controlada.

Dos revisiones describen el impacto del tratamiento con COAP en alimentos (Ferrentino y Spilimbergo, 2011 y Zhou *et al.*, 2016). Se concluye de estos trabajos que el tratamiento con COAP mantiene los atributos de calidad en la mayoría de los alimentos, aunque ello depende del alimento y de las condiciones de presión, temperatura y tiempo de contacto.

En particular, la Tabla 1.5. muestra los atributos de calidad de los alimentos en los que se ha ensayado el uso de COAP para la inactivación de esporas. En los alimentos sólidos, en general el impacto fue escaso. En el pimentón se observó algo de pérdida de color sobre todo asociado a la temperatura, pero mucho menor que el que ocurre cuando se trata con vapor de agua (Calvo y Torres, 2010). El cacao, por



el contrario, mantuvo su perfil de compuestos antioxidantes fenólicos que le daban carácter de alimento funcional por la fracción de flavanoles (Calvo *et al.*, 2007). En estos dos productos hubo extracción de agua durante el tratamiento porque la operación se desarrolló con paso continuo de CO<sub>2</sub>. El parcial secado fue un efecto deseable en estos dos casos, pues ambas materias primas se habían humedecido para conseguir una mayor inactivación de la carga microbiana altamente esporulada.

Según la legislación, en materiales sólidos que se comercializan deshidratados, el contenido de agua no debe superar el 11-14%, ( $a_w < 0,95$ ) para evitar la proliferación de microorganismos durante el almacenamiento. En los tiempos necesarios de tratamiento con COAP (30-45 min) para la reducción deseada de la contaminación microbiana, tanto el pimentón (Calvo y Torres, 2010) como el cacao (Calvo *et al.*, 2007) se secaron lo suficiente para cumplir con esos criterios.

Contrariamente, la extracción del agua durante el tratamiento con COAP podría ser un efecto muy adverso para la calidad de otros productos, dado que causaría su secado. Ello finalmente podría generar encogimiento, alteración de la estructura funcional, etc.

La presencia de agua también tuvo mucha relevancia en el grado de germinación de granos de trigo (Park *et al.*, 2012a) y de semillas de cebada (Park *et al.*, 2013a), demostrando ser perjudicial. En las semillas de alfalfa, no se observaron efectos negativos ni en la germinación ni en la viabilidad después del tratamiento con COAP (Mazzoni *et al.*, 2001).

**Tabla 1.5.** Atributos de calidad de los alimentos en los que se ha ensayado el uso de COAP para la inactivación de esporas.

Alimento	Observaciones	Referencia
Zumos de manzana	Sin cambios significativos en pH y °Brix	Bae <i>et al.</i> , 2009
	Sin cambios en azúcares, contenido en ácidos y concentración de polifenoles, pero algo de pérdida de aromas	Gasperi <i>et al.</i> , 2009
Crema de manzana	Sin cambios en el color o viscosidad a bajas temperaturas	Casas <i>et al.</i> , 2012
	Sin cambios en el pH Ligera reducción en el contenido en vitamina C	
Zumos de naranja	Sin cambios en el pH, acidez, contenido en fenoles	Kincal <i>et al.</i> , 2006, Niu <i>et al.</i> , 2010
	Pérdida de compuestos de bajo peso molecular pero sin cambios significativos en el análisis sensorial	
	Menor grado de clarificación Menor viscosidad	
Leche cruda	Cambios en la textura debido a desnaturalización de la caseína por reducción de pH	Tisi, 2004
	Inhibición de la velocidad de proteólisis	
Pimentón	Ligera reducción de color	Calvo y Torres, 2010
	Reducción del contenido en agua	
Polvo de cacao	Sin cambios en el contenido de polifenoles ni en la fracción de flavanoles	Calvo <i>et al.</i> , 2010
	Reducción del contenido en agua	
Granos de trigo	Sin cambios significativos en la germinación en los tratamientos con COAP solo. El agua como aditivo redujo el grado de germinación	Park <i>et al.</i> , 2012a
Semillas de cebada	Reducción del grado de germinación. Muy significativo en presencia de agua	Park <i>et al.</i> , 2013a
Semillas de alfalfa	Sin diferencias significativas en la velocidad de germinación	Mazzoni <i>et al.</i> , 2001

En los alimentos líquidos tratados con COAP para lograr su esterilización, se observó cierta reducción en el pH por formación de ácido carbónico, como por ejemplo en leche (Tisi, 2004), no así en los zumos que ya eran ácidos naturalmente. En éstos, no se reportaron variaciones en el contenido de azúcares o fenoles (Gasperi *et al.*, 2009, Kincal *et al.*, 2006 y Niu *et al.*, 2010). En cuanto a los aromas, el tratamiento con COAP redujo las concentraciones de compuestos volátiles (Gasperi *et al.*, 2009) como de naranja (Niu *et al.*, 2010), aunque no de forma importante y en cualquier caso, en menor medida que el tratamiento convencional térmico. De tal forma, que cuando se hicieron ensayos sensoriales, los panelistas no identificaron diferencias entre los controles y los zumos tratados con COAP (Kincal *et al.*, 2006). En el zumo de naranja se identificó menor grado de clarificación y por tanto mayor estabilidad, que se asoció al efecto de homogeneización del COAP (Niu *et al.*, 2010).

En la leche se encontró un cambio en la textura y finalmente la precipitación de la caseína a temperaturas y presiones elevadas por la mencionada reducción del pH. A cambio el COAP fue inhibitorio de la velocidad de proteólisis de la leche (Tisi, 2004).

#### **1.7.6. Efecto del tratamiento con COAP en la calidad de los materiales sensibles**

La Tabla 1.6. contiene un resumen de las observaciones en las principales características de calidad de los materiales sensibles tratados con COAP para la eliminación de esporas. Se ha incluido una columna con el aditivo empleado porque podría tener algún impacto per sé en la calidad del material. Dado que el tratamiento en estos materiales se produjo a temperatura suave (típicamente menos de 40 °C) y con pequeñas cantidades de aditivos, no hubo en términos generales, importantes alteraciones ni en la estructura ni

en las propiedades físicas y químicas de los mismos. A continuación se discute en detalle cada caso.

El interés médico de los biopolímeros reside en su uso como implantes, articulaciones artificiales, en la manufactura de instrumentos quirúrgicos flexibles, etc. por tanto, en estos materiales el principal reto de cualquier técnica de esterilización es mantener su biocompatibilidad y su funcionalidad, asociada fundamentalmente a su estructura y propiedades mecánicas.

Jiménez *et al.* (2007) estudiaron la compatibilidad de un amplio espectro de polímeros de grado médico con CO<sub>2</sub> líquido, sólo y con trazas de peróxido de hidrógeno a temperaturas entre 17 y 24 °C y a 65 bar. En los polímeros más amorfos observaron retención, hinchamiento y distorsión mientras que en los más cristalinos observaron poco efecto a la exposición al COAP. Por el contrario, no encontraron diferencias significativas en la fuerza tensil en la mayoría de los materiales.

En condiciones supercríticas, adecuadas para la inactivación de esporas de *B. subtilis*, Ellis y colaboradores estudiaron las propiedades de polietileno de ultra-alto peso molecular después de un tratamiento de 2 h a 37 °C y 170 bar con CO<sub>2</sub> modificado con pequeñas cantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los resultados de los ensayos mecánicos (máxima carga y elongación) corroboraron que el tratamiento tenía nulo impacto en las muestras. Además el espectro FTIR mostró que tampoco hubo oxidación por las pequeñas cantidades de modificadores durante el tratamiento (Ellis *et al.*, 2010).

**Tabla 1.6.** Propiedades físico-químicas y mecánicas de biomateriales y otros productos sensibles en los que se ha ensayado el uso de COAP para la inactivación de esporas.

Material	Aditivo	Observaciones en la calidad	Referencia
Polietileno de ultra alto peso molecular para articulaciones artificiales	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O + Etanol	Sin alteraciones en la fuerza mecánica y la elongación. Sin variaciones en las propiedades químicas de oxidación	Ellis <i>et al.</i> , 2010
Estructuras porosas de ácido poli-L-láctico		Sin alteraciones en la biocompatibilidad y estructura	Lanzalaco <i>et al.</i> , 2016
Cilindros de alginato/agarosa y estructuras tridimensionales de colágeno	H <sub>2</sub> O+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ,anhídrido acético	Menor impacto en las propiedades mecánicas y reológicas que la irradiación gamma. Citocompatibilidad de los geles y estructuras de colágeno mineralizado comparable a otros tratamientos de esterilización. Sin alteraciones en la viabilidad y proliferación celular de raíz mesenquimal humana	Bernhardt <i>et al.</i> , 2015
Hidrogeles PEG (90% agua)		Sin alteraciones en las propiedades viscoelásticas, pH, contenido en agua, estructura y respuesta biológica provocada	Karaganagi <i>et al.</i> , 2011
Aloinjertos de huesos y tendones humanos	APA	Sin alteraciones importantes en las propiedades elásticas (pre-rendimiento) y plásticas (post-rendimiento) de los injertos de huesos. Muestras de tendones significativamente más brillantes y claras que los controles atribuidas a la extracción de lípidos. Sin cambios en la estructura celular	Nichols <i>et al.</i> , 2009
Aloinjertos de huesos corticales de conejo	APA	Mantenimiento de las propiedades mecánicas dinámicas y quasi-estáticas	Russell <i>et al.</i> , 2013a

Material	Aditivo	Observaciones en la calidad	Referencia
Aloinjertos de huesos corticales de oveja	APA	Sin alteraciones en estrés, rigidez o fuerza de ruptura en ninguna orientación	Russell <i>et al.</i> , 2015
Aloinjerto de hueso humano en polvo		Mantenimiento de la biocompatibilidad de las muestras según normativa ISO 10993	Chang <i>et al.</i> , 2011
Aloinjertos de huesos	APA	Buenas propiedades de osteoconductividad, biocompatibilidad, tolerancia	Russell <i>et al.</i> , 2013b
Aloinjertos de menisco	APA	Mayor rigidez y relajación de estrés comparada con control. Sin diferencias significativas en las medidas histológicas. Menor fracción de huecos y mayor porcentaje de matriz extracelular en las zonas exteriores que interiores. Sin diferencias significativas en los extremos en análisis por secciones	Bui <i>et al.</i> , 2015
Aloinjertos de tejidos blandos		Significativa menor rigidez y dureza que los aloinjertos no procesados o tratados con irradiación gamma. Pero mayor que la de los nativos intactos	Baldini <i>et al.</i> , 2014
Tejidos para implantes de polivinildenfluoruro y polipropileno	O <sub>3</sub>	Oxidación de la superficie por acción del ozono. Decoloración en los tratamientos con ozono como aditivo	Cinquemani <i>et al.</i> , 2008
Matriz acelular pulmonar	APA	Sin degradación estructural. Preservación de los atributos biológicos	Wehmeyer <i>et al.</i> , 2015
Matriz acelular dérmica	APA	Sin cambios significativos en la susceptibilidad a la digestión de colagenasa ni en las características mecánicas. Escasa alteración de la estructura del tejido	Qiu <i>et al.</i> , 2009

Material	Aditivo	Observaciones en la calidad	Referencia
Tejido de membrana amniótico	APA+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sin alteraciones significativas en la arquitectura del tejido, contenido extracelular u organización (glicosaminoglicanos, elastina, colágeno o laminina), en el crecimiento celular o en la integridad mecánica	Balestrini <i>et al.</i> , 2016
Corticosteroides de liberación ocular y pulmonar	Agua	Sin trazas de productos de descomposición o de cambios físico-químicos. Dependiendo del tipo de corticosteroide, algún cambio en la poliforma en presencia de agua	Zani <i>et al.</i> , 2013
Materiales termoset y sus superficies bioactivas	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sin modificaciones notables de las propiedades mecánicas. Algo de reducción en el contenido de monómeros no reactivos. En presencia de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ligera reducción de la dureza de superficie. Elevada actividad antimicrobiana en los materiales bioactivos derivados	Donati <i>et al.</i> , 2012
Dispositivos microfluídicos de PMMA		Si alteraciones en las principales propiedades del polímero, aunque con cambios negativos en la rugosidad superficial y perfil de microcanales	Yavuz <i>et al.</i> , 2016
Memorias USB y dispositivos electrónicos	Mezclas de agua y/o metanol con peróxido de hidrógeno, ácido fórmico	Sin cambios en su funcionalidad después de varios ciclos de esterilización	Shieh <i>et al.</i> , 2009

El impacto del tratamiento con COAP también se investigó en polímeros porosos 3D. En ácido poli-L-láctico (PLA), que se utiliza en ingeniería de tejidos y aplicaciones de medicina regenerativa, el tratamiento con COAP no alteró su biocompatibilidad demostrado mediante ensayos de cultivos biológicos, ni su morfología según análisis calorimétricos (de cristalinidad y temperatura de fusión). Tampoco se observaron modificaciones en la porosidad de la estructura mediante SEM (Lanzalaco *et al.*, 2016).

Los cilindros de agarosa/alginato sirven como ejemplo estructuras 3D bioresorbibles; mientras que las estructuras de colágeno mineralizado se utilizan como apósitos de heridas y en la reparación de tejidos. En ambos casos es muy importante la citocompatibilidad. Bernhardt y colaboradores probaron que después del tratamiento con COAP mezclado con pequeñas cantidades de agua, peróxido de hidrógeno y anhídrido acético, fue posible la proliferación y viabilidad de células madre mesenquimales humanas en estos materiales. En cuanto a las propiedades mecánicas, en los hidrogeles de alginato se observó algo de reducción en la fuerza y en el módulo de compresión. Lo contrario se detectó en las estructuras porosas de colágeno. En ambos casos, no obstante, esta ligera variación de las propiedades mecánicas y reológicas fue menor que mediante otras técnicas de esterilización competitivas como la irradiación, la aplicación de óxido de etileno o el uso de vapor de agua (Bernhardt *et al.*, 2015).

El parecido de los hidrogeles a los tejidos vivos abre muchas oportunidades para su aplicación en biomedicina. Hoy los hidrogeles se utilizan en la manufactura de lentes de contacto, productos de higiene, estructuras de ingeniería de tejidos,



sistemas de liberación de fármacos y apósitos para heridas (Caló *et al.*, 2015). Sin embargo, estos materiales tienen un alto contenido en agua y son muy sensibles a la temperatura y a la irradiación. Por ello, el método de esterilización debe ser muy cuidadoso. Jimenez y colaboradores investigaron el impacto del tratamiento con CO<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre hidrogeles de poli(acrilamida-co-ácido acrílico) inoculados con formas vegetativas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Jimenez *et al.*, 2008). Ni las curvas de secado ni las relaciones de hinchamiento de los geles evaluados después del tratamiento presentaron cambios significativos. Tampoco fueron evidentes cambios en la estructura de los hidrogeles según imágenes SEM. En otro trabajo se estudió la inactivación de esporas de *B. atrophaeus* en hidrogeles basados en polietilenglicol (Karajanagi *et al.*, 2011). Los resultados mostraron que los geles tratados no presentaban alteraciones significativas en las propiedades viscoelásticas, pH, contenido en agua, estructura y respuesta biológica provocada, respecto de los geles no tratados.

Varias publicaciones muestran los efectos del tratamiento con COAP sobre aloinjertos por la gran importancia que tiene una adecuada técnica de esterilización en la biocompatibilidad y rechazo en el paciente de estos materiales. Sin embargo, lograr la esterilización frecuentemente compromete las propiedades biomecánicas. Estudios realizados en la esterilización con COAP adicionado con APA de injertos de hueso humano mostraron que las propiedades mecánicas (medidas con ensayos de elongación y deformación) y biomecánicas (medidas con diferencias en densidad, fracción de cenizas, módulo de Young, fuerza de flexión, máxima carga y dureza global) eran superiores que las que generaban los tratamientos con irradiación gamma. Además, los análisis de colágeno entrecruzado no revelaron

diferencias estadísticas con los grupos de control. Consecuentemente, los huesos esterilizados con COAP eran similares a los no tratados con respecto a las propiedades elásticas (pre-rendimiento) y plásticas (post-rendimiento) (Nichols *et al.*, 2009). La misma tendencia fue observada en huesos corticales de conejo sometidos a ensayos mecánicos tanto estáticos como dinámicos (Russell *et al.*, 2013a) y en huesos corticales bovinos, en los que se encontró que el tratamiento con COAP sin o con aditivos (APA) no alteró su tensión, rigidez o energía al fallo en ninguna orientación (Russell *et al.*, 2015). Más aún, Chang y colaboradores demostraron la biocompatibilidad de los injertos de huesos humanos en polvo procesados con COAP de acuerdo a la normativa ISO 10993, que incluye ensayos de irritación intercutánea, de sensibilización cutánea y citotoxicidad (Chang *et al.*, 2011). Posteriormente, se probó también que los aloinjertos de hueso esterilizados con COAP eran osteoconductivos y capaces de curar un defecto tibial de tamaño crítico con menor respuesta inflamatoria que los injertos esterilizados con irradiación gamma con los que se compararon (Russell *et al.*, 2013b).

Contrariamente, los análisis de propiedades biomecánicas e histológicas en menisco indicaron que después del tratamiento con COAP, había una mayor rigidez y relajación de estrés comparados con la muestra control, aunque en menor medida que mediante el tratamiento por irradiación gamma. Pero no había diferencias significativas en los análisis histológicos medidos en porcentaje de huecos, células y matriz extracelular (Bui *et al.*, 2015).

El impacto que la esterilización con COAP de tejidos blandos es muy relevante para su viabilidad como injertos. Por un lado, fotografías realizadas sobre tendones

humanos indicaron que el tratamiento con COAP produjo muestras significativamente más brillantes y claras que los controles. Además, se contabilizó una pérdida del 14% en peso que los autores atribuyeron a la extracción de lípidos ocurrida durante el tratamiento, porque el examen de la estructura celular mediante SEM y TEM no mostró ningún cambio (Nichols *et al.*, 2009). Por otro lado, en muestras de tendones de tibia posteriores se probó que el tratamiento con COAP modificado con APA resultaba en significativamente menos rigidez que los tejidos sin procesar o irradiados y por tanto, en unas previsibles mejores propiedades biomecánicas (Baldini *et al.*, 2014).

En un trabajo de inactivación de esporas utilizando COAP mezclado con ozono, sobre tejidos sintéticos para injertos, hechos de polivinildenfluoruro y polipropileno, se observó oxidación de la superficie y cierto grado de decoloración por el fuerte carácter oxidante y blanqueante del ozono (Cinquemani *et al.*, 2008).

Los efectos del tratamiento con COAP y pequeñas cantidades de APA, se estudiaron sobre membranas amnióticas que se utilizan en el tratamiento de heridas por quemadura. Los ensayos mostraron que no se alteraron significativamente la arquitectura y propiedades biofísicas del tejido, ni las cantidades de proteínas de matriz extracelular pertinentes. También se encontró que las membranas amnióticas eran excelentes sustratos para la adhesión y proliferación *in vitro* de células madre derivadas de tejido adiposo. Las células en cultivo durante 24 h continuaron la proliferación al cabo de varios días después (Wehmeyer *et al.*, 2015).

Qiu y colaboradores estudiaron la esterilización de matrices acelulares dérmicas con COAP modificado con APA. No encontraron cambios significativos en la susceptibilidad a la digestión de colagenasa ni en las características mecánicas. Además observaron escasa alteración de la arquitectura del tejido (Qiu *et al.*, 2009). Posteriormente, se estudió el método en matrices pulmonares acelulares con potenciales aplicaciones en medicina regenerativa. De nuevo, no se encontraron alteraciones significativas en la arquitectura del tejido, contenido y organización de matriz extracelular, adhesión celular o integridad mecánica. Más aún, estos atributos no cambiaron después de 6 meses en tampón salino (Balestrini *et al.*, 2016).

Los glucoecorticosteroides son una clase de fármacos que se usan ampliamente en el tratamiento de alergias, inflamación de las vías respiratorias y oculares. El impacto físico-químico de la esterilización de estos fármacos se investigó en dos ejemplos, un corticosteroide de liberación ocular (beclometasona, BDP) y otro pulmonar (budesonida, BDN). No aparecieron trazas de productos de descomposición de estos productos en los cromatogramas después del tratamiento, aunque se observó una reducción de la valoración del 3,5 % en BDP y del 100 % en BDN, que los autores asociaron a modificaciones en la composición de la fase sólida, en este último caso, relacionado con la presencia de agua, porque en ensayos en seco, no se detectó. Por otro lado, la distribución de tamaño de partícula no se vio afectada en ninguno de los dos fármacos (Zani *et al.*, 2013).

El potencial del COAP en presencia de  $H_2O_2$  se exploró como técnica de esterilización en materiales termoset y sus superficies bioactivas. No se

encontraron modificaciones notables de sus propiedades mecánicas, aunque se detectó algo de reducción en el contenido de monómeros no reactivos que los autores achacaron a las propiedades disolventes del CO<sub>2</sub> y que en cualquier caso, era un efecto deseado cuando estos materiales se utilizan en restauración dental. Por la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se observó una ligera reducción de la dureza de superficie, asociada a cierto grado de oxidación, que no impidió una elevada actividad antimicrobiana en los materiales bioactivos (con plata) derivados (Donati *et al.*, 2012).

Los dispositivos microfluídicos tienen potencial en numerosas aplicaciones biomédicas. Un material frecuente de fabricación es polimetilmetacrilato (PMMA). En un trabajo se estudió el efecto del tratamiento con COAP para su esterilización y se comparó con otras técnicas. En las condiciones optimizadas de esterilización a 120 bar, 40 °C y 60 min, no se detectaron alteraciones de las principales propiedades del polímero, incluido el valor de *Tg*. Contrariamente, se detectó pérdida de la rugosidad superficial y cambios en los perfiles de microcanales que eran indeseables en aplicaciones microfluídicas (Yavuz *et al.*, 2016).

Shieh y colaboradores estudiaron el impacto que el tratamiento con COAP y pequeñas cantidades de modificadores químicos tenía en la esterilización de superficies metálicas y pequeños dispositivos electrónicos. En las condiciones optimizadas de operación de 100 bar, 50 °C y 45 min, una Memoria USB pudo ser reutilizada después de haber sido sometido hasta a ocho tratamientos sin perder los archivos almacenados. (Shieh *et al.*, 2009).

## 1.8. OBJETIVOS DE LA TESIS

El objetivo de este trabajo fue estudiar la desactivación de tres tipos de esporas de *bacillus* mediante el uso de CO<sub>2</sub> a alta presión. Se eligieron por su importancia en la seguridad biológica de alimentos y en el ámbito militar. En concreto, se usó *B. cereus* que es un microorganismo muy frecuente en alimentos y por ello, su recuento está legislado. Las esporas de *Aliciclobacillus acidoterrestris* causan alteraciones en los derivados de frutas porque están adaptadas a la supervivencia en medios ácidos y son resistentes a los regímenes típicos de pasteurización, causando importantes pérdidas económicas en el sector. Aunque no está legislado su recuento, los clientes de productos frutícolas normalmente exigen su eliminación. Finalmente, se estudió la inactivación de esporas de *Bacillus thuringiensis* como simulante de *Bacillus anthracis* (ántrax) dado que comparten mismo genoma y tienen similar resistencia a los tratamientos de esterilización. Mientras que *B. thuringiensis* es inocuo (clasificado como tipo I) para manejar en el laboratorio, *B. anthracis* es altamente patógeno y sólo puede manejarse en laboratorios de seguridad nivel IV con permiso para hacerlo. La importancia de la eliminación de estas esporas está en su potencial uso como bioarma y por tanto, por su relevancia en la seguridad.

Como quedó patente en la revisión de la bibliografía de la introducción, la inactivación de las esporas es en general más fácil en medios acuosos que en medios sólidos, máxime si están deshidratados. Por ello, en este trabajo, primero se realizó la inactivación de las tres especies de esporas en suspensión acuosa y luego una vez contaminaban distintos sustratos sólidos en función de su aplicación. El

objetivo fue evaluar la eficacia del COAP en materias primas con baja actividad de agua, donde había poca experiencia y poca literatura.

Los alimentos que se utilizaron como sustrato modelo fueron una crema de frutas (manzana) para la inactivación de *A. acidoterrestris*, que es un sustrato de alta viscosidad y ácido que servía adecuadamente como ejemplo de derivados de frutas. Por esta razón, el trabajo fue apoyado y seguido por la empresa Juver Alimentación, S.A.

La inactivación de *B.cereus* se estudió en pimentón, como ejemplo en general de productos en polvo y en particular de especias y hierbas. En estos productos procedentes del suelo, la carga contaminante es muy elevada, destacando este microorganismo por su concentración y frecuencia. Además en estos productos, se debe preservar el aroma, color y resto de propiedades sensoriales por lo que las técnicas de esterilización deben ser suaves. Actualmente el tratamiento con vapor de agua y la irradiación son los tratamientos de esterilización más frecuentes, pero causan pérdidas en la calidad y estabilidad de las especias.

El estudio de estos dos ejemplos estuvo enmarcado dentro de un proyecto financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, CTQ2010-18537.

El tercer ejemplo fue la inactivación de esporas de *B. thuringiensis* una vez que contaminaban el equipo del combatiente: traje, botas, guantes y dispositivos electrónicos que lleva. Se hizo simulando la carga biológica que causaría en este equipamiento un hipotético ataque con bioarmas atomizadas en el aire. El proyecto

fue financiado por el Ministerio de Defensa de España, Dirección General de Armamento y Material, expediente código 1003211003200.

En todos ellos se estudiaron los parámetros que afectan a la inactivación de las esporas: presión, temperatura, actividad de agua, pH del entorno, duración del tratamiento, tipo de sustrato, uso de aditivos para el CO<sub>2</sub>, etc.

Además, se evaluaron los parámetros de calidad y funcionalidad por la importancia que tiene en la explotación de la tecnología y en la comercialización de los productos.

Los objetivos específicos de la investigación de esta tesis fueron:

**Capítulo 2.** Estudio de la inactivación con COAP de esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en crema de manzana y su influencia en la calidad final del producto. Para ello se siguieron los parámetros reológicos de la crema, la variación de pH, la concentración de vitamina C y el color, pues son las características más relevantes de su comercialización.

**Capítulo 3.** Estudio del impacto de las principales variables de operación en la desactivación de *B. cereus* con COAP en suspensión acuosa.

**Capítulo 4.** Estudio de la inactivación de la flora natural del pimentón, cuyo principal contaminante biológico son las esporas de *B. cereus* utilizando COAP, aceites esenciales y la mezcla de ambos.



**Capítulo 5.** Estudio de la inactivación de esporas de *B. thuringiensis* con COAP, primero en agua para determinar las variables de operación más relevantes y luego sobre distintos tejidos del traje de combatiente y sobre material electrónico. Al final del capítulo se evaluó el efecto que el tratamiento tiene sobre la calidad de los materiales y sobre su funcionalidad.

## 1.9. REFERENCIAS

AESAN. 2010. La seguridad alimentaria en la unión europea: bases para la confianza.

Bae, Y. Y., Lee, H. J., Kim, S. a, & Rhee, M. S. (2009). Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice by supercritical carbon dioxide. *International Journal of Food Microbiology*, 136(1), 95–100.

Balestrini, J. L., Liu, A., Gard, A. L., Huie, J., Blatt, K. M. S., Schwan, J., Niklason, L. E. (2016). Sterilization of Lung Matrices by Supercritical Carbon Dioxide. *Tissue Engineering Part C-Methods*, 22(3), 260–269.

Ballestra, P., & Cuq, J.-L. (1998). Influence of Pressurized Carbon Dioxide on the Thermal Inactivation of Bacterial and Fungal Spores. *LWT - Food Science and Technology*, 31(1), 84–88.

Barbosa-Canovas, Swanson, & Pothakamury, U. R. (1999). *Nonthermal Preservation of Foods (Food Science and Technology)*. Editorial Acribia.

- Bernhardt, A., Wehrl, M., Paul, B., Hochmuth, T., Schumacher, M., Schuetz, K., & Gelinsky, M. (2015). Improved Sterilization of Sensitive Biomaterials with Supercritical Carbon Dioxide at Low Temperature. *Plos One*, 10(6).
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
- Caló, E., & Khutoryanskiy, V. V. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 65, 252–267.
- Calvo, L., Muguerza, B., & Cienfuegos-Jovellanos, E. (2007). Microbial inactivation and butter extraction in a cocoa derivative using high pressure CO<sub>2</sub>. *The Journal of Supercritical Fluids*, 42(1), 80–87.
- Calvo, L., & Torres, E. (2010). Microbial inactivation of paprika using high-pressure CO<sub>2</sub>. *The Journal of Supercritical Fluids*, 52(1), 134–141.
- Casas, J., Tello, J., Gatto, F., & Calvo, L. (2016). Microbial inactivation of paprika using oregano essential oil combined with high-pressure CO<sub>2</sub>. *The Journal of Supercritical Fluids*, 116, 57–61.

- Casas, J., Valverde, M. T., Marín-Iniesta, F., & Calvo, L. (2012). Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high pressure CO<sub>2</sub> in apple cream. *International Journal of Food Microbiology*, 156(1), 18–24.
- Casas, J., & Calvo, L. (2013). Inactivation of spores by high pressure CO<sub>2</sub>. *Proceeding of the 6th International Symposium on High Pressure Process Technology*. Belgrade, Serbia, September 8-11.
- Casp, A., & Abril, J. (2003). *Procesos De Conservacion De Alimentos*. S.A. Mundi-Prensa Libros.
- Chang, L., Chen, Y.-J., Chen, Y.-P., Chen, C.-T., & Yu, W.-H. (2011). Biocompatibility of human bone allograft powder processed by supercritical CO<sub>2</sub>. *Formosan Journal of Musculoskeletal Disorders*, 2(2), 55–61.
- Checinska, A., Fruth, I. a, Green, T. L., Crawford, R. L., & Paszczynski, A. J. (2011). Sterilization of biological pathogens using supercritical fluid carbon dioxide containing water and hydrogen peroxide. *Journal of Microbiological Methods*, 87(1), 70–5.
- Christensen, T.W., 2005. Inactivating organisms using carbon dioxide at or near its supercritical pressure and temperature conditions. WO2005001059.
- Christensen, T.W., Burns, D.C., White, A.L., Ganem, B., Eisenhut, A.R., 2006. Sterialization methods and apparatus which employ additive-containing supercritical carbon dioxide sterilant. US7108832.
- Christensen, T.W., 2009. Inactivating organisms using carbon dioxide at or near its supercritical pressure and temperature conditions. US7560113.

- Cinquemani, C., Bach, E., & Schollmeyer, E. (2007). Using compressed CO<sub>2</sub> and ozone for inactivating pathogenic germs- A novel sterilisation process for medical(bio-) polymers. Proceeding of the 5th International Symposium on High Pressure Process Technology and Chemical Engineering.
- Dillow, A. K., Dehghani, F., Hrkach, J. S., Foster, N. R., & Langer, R. (1999). Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(18), 10344–10348.
- Donati, I., Benincasa, M., Foulc, M.-P., Turco, G., Toppazzini, M., Solinas, D., Paoletti, S. (2012). Terminal Sterilization of BisGMA-TEGDMA Thermoset Materials and Their Bioactive Surfaces by Supercritical CO<sub>2</sub>. Biomacromolecules, 13(4), 1152–1160.
- Doyle, M. P., Beuchat, L. R., & Montville, T. J. (2001). Microbiología de los Alimentos. Fundamentos y fronteras. Editorial Acribia.
- Ellis, J. L., Titone, J. C., Tomasko, D. L., Annabi, N., & Dehghani, F. (2010). Supercritical CO<sub>2</sub> sterilization of ultra-high molecular weight polyethylene. Journal of Supercritical Fluids, 52(2), 235–240.
- Enomoto, A., Nakamura, K., Hakoda, M., & Amaya, N. (1997). Lethal effect of high-pressure carbon dioxide on a bacterial spore. Journal of Fermentation and Bioengineering, 83(3), 305–307.
- Ferrentino, G., & Spilimbergo, S. (2011). High pressure carbon dioxide pasteurization of solid foods: Current knowledge and future outlooks. Trends in Food Science & Technology, 22(8), 427–441.

- Fraise, A. P., Maillard, J.-Y., & Sattar, S. (2013). Russell, Hugo and Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. Wiley-Blackwell.
- Furukawa, S., Watanabe, T., Tai, T., Hirata, J., Narisawa, N., Kawai, T., Yamasaki, M. (2004). Effect of high pressure gaseous carbon dioxide on the germination of bacterial spores. *International Journal of Food Microbiology*, 91(2), 209–213.
- Furukawa, S., Watanabe, T., Koyama, T., & Hirata, J. (2009). Inactivation of food poisoning bacteria and *Geobacillus stearothermophilus* spores by high pressure carbon dioxide treatment, 20, 53–58.
- Furukawa, S., Watanabe, T., Koyama, T., Hirata, J., Narisawa, N., Ogihara, H., & Yamasaki, M. (2006). Effect of high pressure carbon dioxide on the clumping of the bacterial spores. *International Journal of Food Microbiology*, 106(1), 95–98.
- Gasperi, F., Aprea, E., Biasioli, F., Carlin, S., Endrizzi, I., Pirretti, G., & Spilimbergo, S. (2009). Effects of supercritical CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O pasteurisation on the quality of fresh apple juice. *Food Chemistry*, 115(1), 129–136.
- Gui, F., Wu, J., Chen, F., Liao, X., Hu, X., Zhang, Z., & Wang, Z. (2005). Change of polyphenol oxidase activity, color, and browning degree during storage of cloudy apple juice treated by supercritical carbon dioxide. *European Food Research and Technology*, 223(3), 427–432.

- Haas, G. J., Prescott, H. E., Dudley, E., Dik, R., Hintlian, C., & Keane, L. (1989). Inactivation Of Microorganisms By Carbon Dioxide Under Pressure. *Journal of Food Safety*, 9(4), 253–265.
- Hemmer, J. D., Drews, M. J., LaBerge, M., & Matthews, M. A. (2007). Sterilization of bacterial spores by using supercritical carbon dioxide and hydrogen peroxide. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 80B(2), 511–518.
- Hiperbaric. High pressure processing for food. 2012 Recuperado de: <http://www.hiperbaric.com/en/>, , (Fecha de consulta: 20/02/2017).
- Howell, J., Niu, F., McCabe, S. E., Zhou, W., & Decedue, C. J. (2012). Solvent removal and spore inactivation directly in dispensing vials with supercritical carbon dioxide and sterilant. *AAPS PharmSciTech*, 13(2), 582–9.
- Hu, W., Zhou, L., Xu, Z., Zhang, Y., & Liao, X. (2013). Enzyme Inactivation in Food Processing using High Pressure Carbon Dioxide Technology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(2), 145–161.
- Infoagro. Deterioro de las frutas y hortalizas frescas en el periodo de poscosecha. 2014. Recuperado de: [http://www.infoagro.com/frutas/deterioro\\_poscosecha\\_frutas\\_hortalizas.htm](http://www.infoagro.com/frutas/deterioro_poscosecha_frutas_hortalizas.htm), (Fecha de consulta: 22/11/14).
- Ishikawa, H., Shimoda, M., Shiratsuchi, H., & Osajima, Y. (1995). Sterilization of Microorganisms by the Supercritical Carbon Dioxide Micro-Bubble Method. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(10), 1949–1950.

- Ishikawa, H., Shimoda, M., Tamaya, K., Yonekura, A., Kawano, T., & Osajima, Y. (1997). Inactivation of *Bacillus* Spores by the Supercritical Carbon Dioxide Micro-bubble Method. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(6), 1022–1023.
- Jiménez, A., Thompson, G. L., Matthews, M. A., Davis, T. A., Crocker, K., Lyons, J. S., & Trapotsis, A. (2007). Compatibility of medical-grade polymers with dense CO<sub>2</sub>. *The Journal of Supercritical Fluids*, 42(3), 366–372.
- Jiménez, A., Zhang, J., & Matthews, M. A. (2008). Evaluation of CO<sub>2</sub> -based cold sterilization of a model hydrogel. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(6), 1344–1352.
- Kamihira, M., Taniguchi, M., & Kobayashi, T. (1987). Sterilization of microorganisms with supercritical carbon dioxide. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51(2), 407–412.
- Karajanagi, S. S., Yoganathan, R., Mammucari, R., Park, H., Cox, J., Zeitels, S. M., Foster, N. R. (2011). Application of a dense gas technique for sterilizing soft biomaterials. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(7), 1716–1725.
- Kincal, D., Hill, W. S., Balaban, M., Portier, K. M., Sims, C. A., Wei, C. I., & Marshall, M. R. (2006). A Continuous High-Pressure Carbon Dioxide System for Cloud and Quality Retention in Orange Juice. *Journal of Food Science*, 71(6), C338–C344.
- Lanzalaco, S., Campora, S., Brucato, V., Pavia, F. C., Di Leonardo, E. R., Gherzi, G., Galia, A. (2016). Sterilization of macroscopic poly(L-lactic acid) porous

- scaffolds with dense carbon dioxide: Investigation of the spatial penetration of the treatment and of its effect on the properties of the matrix. *Journal of Supercritical Fluids*, 111, 83–90.
- Mazzoni, A. M., Sharma, R. R., Demirci, A., & Ziegler, G. R. (2001). Supercritical Carbon Dioxide Treatment To Inactivate Aerobic Microorganisms On Alfalfa Seeds. *Journal of Food Safety*, 21(4), 215–223.
- McDonnell, G. (2007). Antisepsis, Disinfection and Sterilization. Types, Action and Resistance,. ASM Press.
- Mouzo. J., 2016. Recuperado de: [http://ccaa.elpais.com/ccaa/2016/07/04/catalunya/1467633422\\_009178.html](http://ccaa.elpais.com/ccaa/2016/07/04/catalunya/1467633422_009178.html), (Fecha de consulta: 20/02/2017).
- Neagu, C., Borda, D., & Erkmen, O. (2013). *Aspergillus ochraceus* spores inactivation with high-pressure carbon dioxide. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(5), 8573–8582.
- Niu, L., Hu, X., Wu, J., Liao, X., Chen, F., Zhao, G., & Wang, Z. (2010). Effect Of Dense Phase Carbon Dioxide Process On Physicochemical Properties And Flavor Compounds Of Orange Juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34, 530–548.
- Norton, T., & Sun, D.-W. (2008). Recent Advances in the Use of High Pressure as an Effective Processing Technique in the Food Industry. *Food and Bioprocess Technology*, 1(1), 2–34.



Novasterilis. Patents for License. 2017a. Recuperado de: <http://www.novasterilis.com/index.php/products/patents-for-license>, (Fecha de consulta: 20/02/2017).

Novasterilis. 2017b. Recuperado de: [www.novasterilis.com](http://www.novasterilis.com) , (Fecha de consulta: 20/02/2017).

OMS. Inocuidad de alimentos. 2015. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>, (Fecha de consulta: 20/02/2017).

Osajima, Y. Shimoda, M. Kawano, T. (1997). Method for inactivating enzymes, microorganisms and spores in a liquid foodstuff. US 5667835 A

Park, H. S., Lee, Y. H., Kim, W., Choi, H. J., & Kim, K. H. (2012 a). Disinfection of wheat grains contaminated with *Penicillium oxalicum* spores by a supercritical carbon dioxide-water cosolvent system. *International Journal of Food Microbiology*, 156(3), 239–244.

Park, H. S., Choi, H. J., & Kim, K. H. (2012 b). Inactivation of *Alternaria brassicicola* spores by supercritical carbon dioxide with ethanol entrainer. *Journal of Microbiological Methods*, 88(1), 185–7.

Park, H. S., Choi, H. J., & Kim, K. H. (2013 a). Effect of Supercritical CO<sub>2</sub> Modified with Water Cosolvent on the Sterilization of Fungal Spore-Contaminated Barley Seeds and the Germination of Barley Seeds. *Journal of Food Safety*, 33(1), 94–101.

Park, H. S., Choi, H. J., Kim, M.-D., & Kim, K. H. (2013 b). Addition of ethanol to supercritical carbon dioxide enhances the inactivation of bacterial spores in the

- biofilm of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 166(2), 207–212.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2002). *Microbiología*. McGraw-Hill Companies.
- Qiu, Q.-Q., Leamy, P., Brittingham, J., Pomerleau, J., Kabaria, N., & Connor, J. (2009). Inactivation of bacterial spores and viruses in biological material using supercritical carbon dioxide with sterilant. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 91B(2), 572–578.
- Rao, L., Xu, Z., Wang, Y., Zhao, F., Hu, X., & Liao, X. (2015). Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by high pressure CO<sub>2</sub> with high temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 73–80.
- Setlow, P. (2003). Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*, 6(6), 550–556.
- Shieh, E., Paszczynski, A., Wai, C. M., Lang, Q., & Crawford, R. L. (2009). Sterilization of *Bacillus pumilus* spores using supercritical fluid carbon dioxide containing various modifier solutions. *Journal of Microbiological Methods*, 76(3), 247–52.
- Shimoda, M., Kago, H., Kojima, N., Miyake, M., Osajima, Y., & Hayakawa, I. (2002). Accelerated Death Kinetics of *Aspergillus niger* Spores under High-Pressure Carbonation, 68(8), 4162–4167.
- Sikes, A., & Martin, C. (1995). Control of Thermophilic spore activity with pressurized CO<sub>2</sub> and egg-white lysozyme. *Army Natick Research*

- Development And Engineering Center Ma, (October 1990). Retrieved from ADA293241
- Sikin, A. M., Walkling-Ribeiro, M., & Rizvi, S. S. H. (2016). Synergistic effect of supercritical carbon dioxide and peracetic acid on microbial inactivation in shredded Mozzarella-type cheese and its storage stability at ambient temperature. *Food Control*, 70, 174–182.
- Sims, M. Estigarribia, E. (2002). Continuous sterilization of aqueous pumpable food using high pressure carbon dioxide. 4th international symposium on high pressure process technology and chemical engineering.
- Spilimbergo, S., Bertucco, a., Lauro, F. M., & Bertoloni, G. (2003 a). Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by supercritical CO<sub>2</sub> treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4(2), 161–165.
- Spilimbergo, S., Dehghani, F., Bertucco, A., & Foster, N. R. (2003 b). Inactivation of bacteria and spores by pulse electric field and high pressure CO<sub>2</sub> at low temperature. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(1), 118–125.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199–1218.
- Tisi, D. (2004). Effect Of Dense Phase Carbon Dioxide On Enzyme Activity And Casein Proteins In Raw Milk. Faculty of the Graduate School Of Cornell University.
- Watanabe, T., Furukawa, S., Tai, T., Hirata, J., Narisawa, N., Ogihara, H., & Yamasaki, M. (2003 a). High Pressure Carbon Dioxide Decreases the Heat

- Tolerance of the Bacterial Spores. Food Science and Technology Research, 9(4), 342–344.
- Watanabe, T., Furukawa, S., Hirata, J., Koyama, T., Ogihara, H., & Yamasaki, M. (2003 b). Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* Spores by High-Pressure Carbon Dioxide Treatment, 69(12), 7124–7129.
- Wehmeyer, J. L., Johnson, A. J., & Zamora, D. (2015). Development of a lyophilized amniotic membrane allograft for the treatment of ophthalmic injury. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 56(7).
- Werner, B. G., & Hotchkiss, J. H. (2006). Continuous Flow Nonthermal CO<sub>2</sub> Processing: The Lethal Effects of Subcritical and Supercritical CO<sub>2</sub> on Total Microbial Populations and Bacterial Spores in Raw Milk. Journal of Dairy Science, 89(3), 872–881.
- White, A., Burns, D., & Christensen, T. W. (2006). Effective terminal sterilization using supercritical carbon dioxide. Journal of Biotechnology, 123(4), 504–15.
- Zani, F., Veneziani, C., Bazzoni, E., Maggi, L., Caponetti, G., & Bettini, R. (2013). Sterilization of corticosteroids for ocular and pulmonary delivery with supercritical carbon dioxide. International Journal of Pharmaceutics, 450(1–2), 218–224.
- Zhang, J., Burrows, S., Gleason, C., Matthews, M. a, Drews, M. J., Laberge, M., & An, Y. H. (2006). Sterilizing *Bacillus pumilus* spores using supercritical carbon dioxide. Journal of Microbiological Methods, 66(3), 479–85.

- Zhang, J., Dalal, N., Gleason, C., Matthews, M. A., Waller, L. N., Fox, K. F., ... An, Y. H. (2006). On the mechanisms of deactivation of *Bacillus atrophaeus* spores using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 38(2), 268–273.
- Zhang, J., Dalal, N., Matthews, M. A., Waller, L. N., Saunders, C., Fox, K. F., & Fox, A. (2007). Supercritical carbon dioxide and hydrogen peroxide cause mild changes in spore structures associated with high killing rate of *Bacillus anthracis*. *Journal of Microbiological Methods*, 70(3), 442–451.
- Zhou, L., Bi, X., Xu, Z., Yang, Y., & Liao, X. (2015). Effects of High-Pressure CO<sub>2</sub> Processing on Flavor, Texture, and Color of Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(6), 750–768.





**2. DESACTIVACIÓN DE ESPORAS DE**  
***Alicyclobacillus acidoterrestris* EN CREMA DE**  
**MANZANA CON CO<sub>2</sub> A ALTA PRESIÓN**





## 2.1. INTRODUCCIÓN

*Alicyclobacillus acidoterrestris* es una bacteria Gram positiva, termoacidófila, aerobia estricta, no patógena, que forma endosporas. Se han identificado tres especies de *Alicyclobacillus* que provocan alteraciones en frutas y zumos. Estas tres especies son *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius* y *A. pomorum*.

Las esporas son la forma más resistente de las bacterias, su estructura es diferente y más compleja en comparación a la de las células vegetativas. Deben parte de su resistencia a la presencia de una capa proteica externa. Por ello, son capaces de sobrevivir en condiciones extremas, tales como pH altos y bajos, altas y bajas temperaturas y alta presión hidrostática, pudiendo perdurar varios años en dichas condiciones (Spilimbergo *et al.*, 2003 y Furukawa *et al.*, 2004). Concretamente, las esporas de *A. acidoterrestris* son capaces de crecer en ambientes de pH bajo (3.0–3.5) y son altamente resistentes al calor, de ahí que subsistan a regímenes típicos de pasteurización aplicados a zumos industriales.

Las esporas de *A. acidoterrestris* se encuentran en la tierra, así que se piensa que la fuente de contaminación es la fruta fresca, que se introduce en el procesamiento sin una limpieza apropiada (Willem *et al.*, 2009).

El daño causado a zumos de frutas es difícilmente detectable, provoca que algunos zumos de frutas clarificados tengan un ligero sedimento, nubosidad o neblina. Pero la principal característica de contaminación por estos microorganismos es un olor y

sabor medicinal o fenólico, causado por Guaiacol, 2,6 dibromofenol o 2,6 diclorofenol.

Los comercializadores exigen a sus proveedores una concentración máxima de 100 ufc·ml<sup>-1</sup> de *A. acidoterrestris*, aunque no es habitual encontrar concentraciones superiores a 10<sup>3</sup> ufc·ml<sup>-1</sup>. El problema reside en que aunque la concentración es baja, como se ha indicado anteriormente, es difícil de desactivar térmicamente.

Debido a que además se encuentra en alimentos termosensibles, se deben buscar otras alternativas para destruirlos con métodos no térmicos. Una posibilidad es la aplicación de CO<sub>2</sub> a alta presión (COAP). El método de conservación con COAP proporciona varias ventajas porque este fluido es inerte, no tóxico, accesible, y económico. En condiciones ambientes, es un gas así que no deja ningún residuo en el producto tratado, y además, es considerado un disolvente GRAS.

Los estudios recientes han demostrado que este fluido puede desactivar la mayoría de los microorganismos, bacterias, levaduras y mohos causantes del deterioro de los alimentos. COAP también ha demostrado desactivar ciertas enzimas, como polifenol oxidasa y peroxidasa, que causa oscurecimiento en frutas, verduras, y zumos (Damar *et al.*, 2005).

Algunos autores han conseguido desactivar endosporas de microorganismos de la familia Bacillaceae, aunque para ello se tuvo que combinar el tratamiento con temperaturas del orden de los 75-90°C. Concretamente, Watanabe *et al.* (2003) lograron la desactivación de *Geobacillus stearothermophilus* al tratarlas con COAP

a 95°C y 300 bar durante 120 minutos. Spilimbergo *et al.* (2003) en esporas de *Bacillus subtilis* cuando lo aplicaron a 75°C y 70 bar durante 120 minutos y Ballestra *et al.* (1998) en esporas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus fluva* cuando lo suministraron a 90°C y 50 bar durante 60 minutos.

Sin embargo, existen factores que podrían dificultar la desactivación de microorganismos en los alimentos con COAP. Primeramente, las matrices complejas son ambientes protectores que dificultan la desactivación bacteriana. En estudios realizados en formas vegetativas, parece que la mayor proporción de lípidos y materias grasas dificulta la penetración del CO<sub>2</sub>. También la capacidad de tamponamiento del medio afecta la desactivación microbiana (García-González *et al.*, 2007). En cuanto a organismos esporulados, hay menos trabajo realizado, aunque Furukawa *et al.* (2009) demostraron la influencia de la presencia de sales y azúcares en la desactivación de esporas de *Geobacillus stearothermophilus*, ambos ejercían un efecto protector en proporción con la concentración de soluto.

Por otro lado, la viabilidad de este método de conservación de alimentos depende del efecto que cause el CO<sub>2</sub> en el producto tratado. Concretamente, los alimentos tratados utilizando COAP podrían sufrir acidificación, extracción de compuestos volátiles u otros efectos adversos como pérdida de vitamina C, cambios en el color y olor (Damar *et al.*, 2005). Por todas estas razones es importante investigar el tratamiento con COAP en cada producto.

Actualmente existe poca bibliografía de desactivación de *A. acidoterrestris* con COAP. Bae *et al.*, 2009, investigaron el efecto letal del CO<sub>2</sub> en las esporas de *A.*

*acidoterrestris*, suspendidas en zumo de manzana. Sims *et al.*, 2002, investigaron el efecto del CO<sub>2</sub> en la desactivación de la flora bacteriana y *A. acidoterrestris* de zumo de naranja.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el uso de COAP en la desactivación de *A. acidoterrestris* en crema de manzana evaluando la influencia de las condiciones de operación en un intervalo más amplio de condiciones que los trabajos previos. Además se investigó el efecto del entorno y del pH. También fue un fin de este trabajo, analizar cómo afectaba el tratamiento a las propiedades de calidad más importantes de la crema.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1. Bacterias**

La cepa utilizada fue *A. acidoterrestris* (CECT 7094 T, GD3B; ATCC 49025; CIP 106132; DSM 3922; LMG 16906) procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo

### **2.2.2. Medio de cultivo**

Se utilizó el medio de cultivo específico recomendado por el proveedor compuesto por tres mezclas. Mezcla A: CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.25 g), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.50 g), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.20 g), extracto de levadura (2.00 g), glucosa (5.00 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3.00 g) y agua destilada. Mezcla B: Solución de elementos traza SL-6, (1.00 ml),

compuesta por  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.10 g),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0.03 g),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0.30 g),  $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.20 g),  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.10 g),  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.02 g),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.03 g) y agua destilada (1l). Mezcla C: Agar (15.00g ) y agua destilada (0.50 l). Primero se esterilizaron las mezclas A, B y C por separado. Para medio líquido se combinaron la mezcla A (preparada con un litro de agua destilada) y la mezcla B. Para medio sólido se combinaron la mezcla A (preparada con medio litro de agua destilada) con la B y finalmente con la C. Todos los reactivos fueron suministrados por Sigma Aldrich.

### 2.2.3. Materia Prima

Se utilizó crema de manzana comercial de la marca Andros, Francia. Los envases de crema de manzana se abrieron en cámara de flujo laminar, comprobando que estaban estériles y libres de actividad enzimática. Una vez abiertos los envases se mantuvieron cerrados y en frigorífico. El  $\text{CO}_2$  (pureza >99.95%, <7 vpm  $\text{H}_2$ , <10 vpm  $\text{O}_2$ , <5 vpm THC, <2 vpm CO, <25 vpm  $\text{N}_2$ ) fue suministrado por Carburos Metálicos, España.

### 2.2.4. Generación y concentración de esporas de *A. acidoterrestris*

Se recuperó el microorganismo a partir de un eppendorf o de un liófilo, en un matraz con unos 100 ml de caldo específico, y se cultivó en un baño con agitación (150 rpm) durante 8 horas a 45 °C. Posteriormente se adicionó 0,1 ml de este cultivo mediante siembra en superficie sobre placas Petri con el medio específico que además contenía 0,1 g·l<sup>-1</sup> de Mn ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , Panreac). De esta forma se prepararon en total 20 placas. Antes de ponerlas boca abajo se dejó que todo el

líquido se absorbiera. A continuación se incubaron en la estufa 2 días a 45 °C. Pasado este tiempo se hizo un lavado de las mismas adicionando dos tandas de 7,5 ml de H<sub>2</sub>O destilada sobre cada una en la superficie. En cada lavado, se realizó un arrastre con un portaobjetos estéril por toda la superficie de la placa para recoger las esporas formadas.

El agua se recogió en cuatro tubos de centrifuga de 75 ml. A continuación se centrifugó a 10.000 r.p.m durante 10 min, se retiró el sobrenadante, se resuspendió en 12 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril y se juntaron todos los botes en uno (48 ml). Después se sometió a tratamiento térmico (90°C durante 15 min) para inactivar las formas vegetativas que pudieran quedar en la suspensión, obteniendo una concentración de 10<sup>8</sup> ufc·ml<sup>-1</sup> de esporas viables; pero se diluyó hasta una concentración de 10<sup>7</sup> ufc·ml<sup>-1</sup> para su posterior adición sobre la crema.

#### **2.2.5. Preparación de la muestra**

Se añadió un 10 % (en peso) del concentrado de esporas de *A. acidoterrestris* a la crema de manzana con lo que se consiguió una concentración de 10<sup>6</sup> ufc·g<sup>-1</sup>.

#### **2.2.6. Determinación de la contaminación de *A. acidoterrestris* en la crema de manzana.**

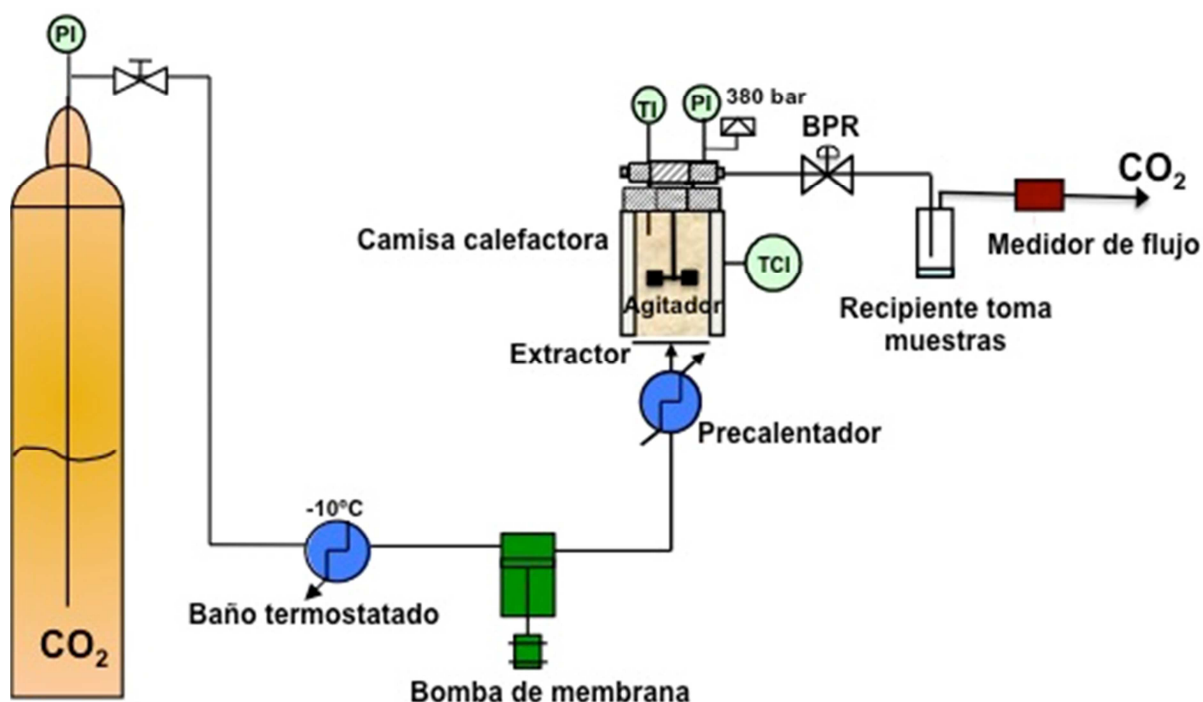
En cámara de flujo laminarse cogió 1 ml de la crema y se preparó una Tabla de diluciones seriadas con el medio específico para obtener la concentración de esporas en la crema por recuento de unidades formadoras de colonia (ufc) en las

placas de Petri con el medio específico. El grado de inactivación se midió como el logaritmo del recuento después de tratamiento (N) respecto de antes del tratamiento ( $N_0$ ). La desviación estándar en las lecturas fue de  $\pm 0,6$  log.

### 2.2.7. Tratamiento con COAP

El equipo para el tratamiento con COAP se muestra en la Figura 2.1. El  $\text{CO}_2$  es suministrado en estado líquido. Pasa por un baño térmicamente controlado (Selecta, Frigiterm-30, España) para enfriarlo a  $-15^\circ\text{C}$  antes de llegar a la bomba de membrana (Milroyal MD23G6M250, Dosapro Milton Roy, Francia). La refrigeración de  $\text{CO}_2$  evita la cavitación durante la presurización. El  $\text{CO}_2$  presurizado se precalienta en una espiral dentro de una camisa calefactora antes de entrar al recipiente de alta presión (Autoclave Engineers, Serie Microclave 401A-8067, USA). La temperatura es leída por un termopar tipo-K situado dentro del recipiente, mientras que la presión es leída en la salida del recipiente con un manómetro con una precisión de 5 bares. La agitación se consigue con un impulsor cuya velocidad de agitación se puede variar entre 50 y 500 rpm. La presión y el caudal de  $\text{CO}_2$  son controlados por la acción combinada de un regulador de presión final (BPR) (Tescom, Serie 26 – 1761 – 24 – 161, Alemania) y el regulador de caudal de la bomba, respectivamente. El equipo tiene un disco de ruptura a 380 bar para evitar problemas de sobrepresión. La masa total de  $\text{CO}_2$  y el caudal puntual se miden utilizando un caudalímetro másico (Alicat Scientific, M- 10SLPM-D, USA) que está conectado en la salida.





**Figura 2.1.** Esquema del equipo de tratamiento con COAP.

### 2.2.8. Desactivación de *A. acidoterrestris* en crema de manzana

Se cargó el recipiente con 20 g de crema a la que previamente se había inoculado con 2 mL de esporas de *A. acidoterrestris*, en cámara de flujo laminar y se llevó al equipo de alta presión manteniendo la esterilidad.

Se colocó el recipiente y se ajustaron los cierres para mantener la presión de CO<sub>2</sub> en el interior. Se colocó la camisa calefactora y se esperó hasta alcanzar la temperatura de operación. En ese momento se abrió la botella de CO<sub>2</sub> y se puso la bomba en funcionamiento para alcanzar la presión de trabajo. Se conectó el agitador a las revoluciones deseadas y se abrió la válvula BPR para provocar el flujo. El CO<sub>2</sub> entró por la parte de abajo del recipiente y atravesó la crema comenzando así el

tiempo de operación. Trascurrido el tiempo establecido, se apagó la bomba, se cerró el suministro de CO<sub>2</sub> y comenzó la despresurización de forma muy lenta para evitar el arrastre de la crema. Típicamente el tiempo de calentamiento y alcance de la presión fue de 5 minutos; mientras que el tiempo de despresurización fue de 12 minutos.

Una vez despresurizado y separado del equipo, el recipiente se llevó de forma estéril a la cámara de flujo laminar, donde se recogió la crema tratada para realizar los posteriores análisis microbiológicos y físico-químicos.

#### **2.2.9. Determinación de la viscosidad**

Se utilizó un viscosímetro TAMSON TC 9 de cilindros concéntricos de espacio estrecho ( $\delta R_1^{-1} < 0,1$ ) donde se pudo variar la tensión tangencial aplicada ( $\tau$ ) y medir la velocidad de deformación ( $\gamma$ ) causada, parámetros que se correlacionaron para determinar el comportamiento reológico y por ende la viscosidad tal y como se muestra en (Aguado *et al.*, 1999).

El método se puso a punto midiendo la viscosidad a diferentes temperaturas y se determinó que la temperatura óptima para la medida era 30°C donde se obtenía un mayor rango de valores medidos. También se comprobó que las medidas de viscosidad eran estables a partir de los 15 minutos. La desviación estándar en la determinación de los parámetros reológicos fue de +/- 0,02 en el índice de consistencia (k) y de +/- 0,04 en el índice de comportamiento (n).

### 2.2.10. Vitamina C

La concentración de ácido ascórbico se midió semi-cuantitativamente por cambio de color en tiras reactivas, en un rango de 0-2000 mg·l<sup>-1</sup>, Merck.

### 2.2.11. Color

El color se midió por observación de las muestras a simple vista, asignando una escala de valores: --- si no se observaba cambio de color, x si se oscurecía levemente, xx si el oscurecimiento era mayor y xxx si la crema se volvía negra.

### 2.2.12. pH

Se midió con un pH-metro Basic 20+, Crison, Barcelona, España. La desviación estándar fue de +/- 0,05.

Las acidificaciones del medio específico, se realizaron con ácido sulfúrico al 96% (Scharlau) y ácido cítrico al 99% (Panreac) añadiendo gota a gota hasta conseguir el pH deseado.

### 2.2.13. Reynolds de agitación

Se definió como:

$$Re = \frac{D \cdot \omega \cdot \rho}{\mu}$$

Donde  $D$  es el diámetro del recipiente (m),  $\vartheta$  es la velocidad de agitación ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ),  $\delta$  es la densidad del fluido (crema de manzana) ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) y  $\mu$  es la viscosidad ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

## 2.3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se inoculó la crema de manzana con esporas de *A. acidoterrestris*, y sobre esta materia prima, se hicieron los ensayos del tratamiento con COAP. Puesto que las variables más importantes de la operación son presión, temperatura y tiempo de tratamiento, en los primeros apartados de esta sección, se muestran los resultados obtenidos en la exploración de estos parámetros. Después se analiza el efecto del medio (la crema) en la eficacia del método. A continuación, se muestran una serie de mejoras para facilitar el contacto entre el  $\text{CO}_2$  y la crema puesto que ésta es muy viscosa.

Finalmente, se analizaron los parámetros de calidad más relevantes desde el punto de vista de comercialización de la crema de manzana, antes y después de cada tratamiento con COAP.

### 2.3.1. Efecto de la temperatura

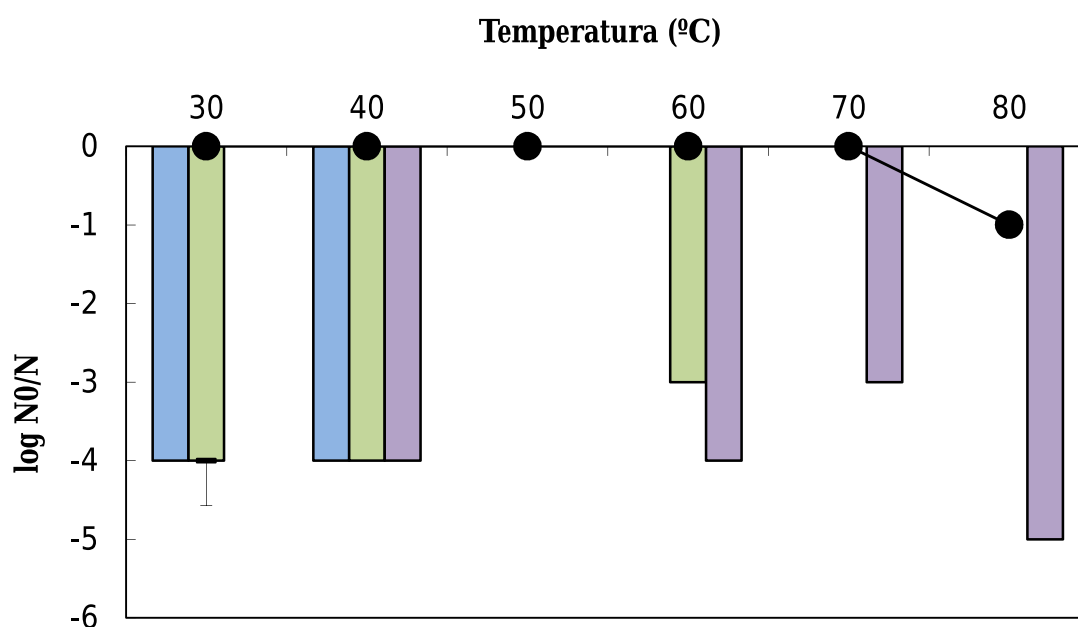
La Figura 2.2 muestra el efecto de las condiciones de operación en la desactivación de esporas de *A. acidoterrestris* en crema de manzana. También se incluye por

motivos de comparación el grado de desactivación alcanzado cuando sólo se aplica calor. Ello permitió evaluar el efecto puro del CO<sub>2</sub>.

En primer lugar, se observó que a 30°C se conseguía una desactivación importante (4 ciclos logarítmicos) de *A. acidoterrestris* en crema de manzana. Este resultado es relativamente sorprendente porque tal y como se ha comentado en la introducción, para desactivar organismos esporulados de tipo bacilo, normalmente hay que alcanzar temperaturas del orden de los 70-90°C. Por el contrario, no se consiguió la desactivación total ni alcanzando 80°C.

En segundo lugar, si se comparan los resultados obtenidos con CO<sub>2</sub> con los obtenidos con el tratamiento térmico, se comprueba que el CO<sub>2</sub> tiene efecto letal por sí mismo. Este hecho ya había sido publicado previamente por otros autores (Spilimbergo *et al.*, 20003, Watanabe *et al.*, 2003 y Ballestra *et al.*, 1998). Por ejemplo, con el tratamiento con COAP se consiguen desactivaciones típicamente en el entorno de los 4 ciclos logarítmicos, mientras que a la misma temperatura, pero presión atmosférica y sin la presencia del CO<sub>2</sub>, prácticamente no hay efecto antimicrobiano. Tan sólo a los 80°C cuando se aplicó solo calor, comenzó cierta desactivación de *A. acidoterrestris*, temperatura que coincide con las típicamente establecidas para “el despertar” térmico de las esporas (Finley, N. *et al.*, 1961 y Levinson, H.S. *et al.*, 1969). Precisamente, creemos que esa es la razón por la cual, al aplicar el COAP a esa temperatura también aumentó la letalidad de *A. acidoterrestris* (cinco ciclo logarítmicos).

La explicación de porqué el COAP tiene efecto letal incluso a bajas temperaturas podría residir en que en medios con actividad de agua alta, podría promover la activación y germinación de las esporas (Ballestra *et al.*, 1998, Wanatabe *et al.*, 2003 y Furukawa *et al.*, 2009). Este fenómeno estaría fuertemente asociado a la reducción del pH del medio por disolución del CO<sub>2</sub>, como se discutirá más adelante. Por ello, en medios deshidratados no se consiguieron desactivaciones completas de esporas hasta no superar los 85-90°C (Calvo *et al.*, 2007, y Calvo y Torres, 2010).



**Figura 2.2.** Desactivación de *A. acidoterrestris* con COAP aplicado a distintas presiones y temperaturas y con tratamiento térmico. Otras condiciones de operación: tiempo de tratamiento: 30 minutos, caudal de CO<sub>2</sub>: 4 g·min<sup>-1</sup>, velocidad de agitación: 500 rpm. ■ 100 bar, ■ 150 bar, ■ 350 bar, ● 1bar en atmósfera de aire.

### 2.3.2. Efecto de la presión

Tampoco existen diferencias significativas en la desactivación de *A. acidoterrestris* a presiones de aplicación del CO<sub>2</sub> comprendidas entre 100 y 350 bar. Shimoda, *et al.* (2002), obtuvieron similares resultados a presiones entre 50 y 190 bar (a 50°C), en esporas de *Aspergillus niger* en solución salina. De la misma forma, se encontró que tampoco tenía un efecto importante la presión en la eliminación de bacilos esporulados que contaminaban naturalmente polvo de pimentón (Calvo *et al.*, 2010) y cacao (Calvo *et al.*, 2007).

En general, un aumento de la presión al aplicar CO<sub>2</sub> tendría impacto si ayudase a su solubilización, consiguiendo rebajar el pH o generase algún daño a la estructura del microorganismo. Sin embargo, en el intervalo de presiones exploradas, estos efectos no tienen relevancia. Por un lado, la crema ya tiene un pH reducido de partida. Además el *A. acidoterrestris* es ácido tolerante, hecho que se ha comprobado estudiando el crecimiento del microorganismo en cultivo, reduciendo el pH del medio hasta 2,5 con un ácido orgánico (ácido cítrico) y con un ácido inorgánico (ácido sulfúrico). El *A. acidoterrestris* era capaz de crecer en estos medios tan ácidos, aunque a menor velocidad que en el medio específico con el pH óptimo (3,5) (datos no mostrados).

Por otro lado, se comprobó en otros microorganismos, y especialmente en las formas esporuladas, que la presión hidrostática en los intervalos utilizados en el método con COAP no tiene efecto per sé (Norton y Sun, 2008). Concretamente, en ensayos previos que se realizaron sobre esporas de *A. acidoterrestris* usando la

técnica de Altas Presiones Hidrostáticas, no se detectó desactivación de las mismas ni a 6000 bar (Lee *et al.*, 2002 y Buzrul *et al.*, 2005).

### 2.3.3. Efecto del tiempo de tratamiento

En la Tabla 2.1 se muestra el efecto del tiempo de tratamiento tanto en los ensayos realizados con CO<sub>2</sub> como en los realizados aplicando solo calor. En ninguna de las dos operaciones, el aumento del periodo de tratamiento tuvo ninguna ventaja. Ello unido a que cuanto más largo sea el tratamiento, más caro resulta y mayores efectos indeseables causa tanto en la reología como en las propiedades sensoriales de la crema, invita a mantener la duración del procedimiento lo más corta posible. En los ensayos de CO<sub>2</sub> realizados en el resto del trabajo se operó siempre con 30 min, aunque este intervalo debe ser optimizado en función de las condiciones y forma de operación.

**Tabla 2.1.** Efecto del tiempo de tratamiento en la desactivación de *A. acidoterrestris* mediante el uso de COAP y mediante calor. Otras condiciones de operación: velocidad de agitación: 500 rpm, caudal de CO<sub>2</sub>: 2g · min<sup>-1</sup>.

Muestra	Presión (bar)	T (°C)	t (min)	Masa de CO <sub>2</sub> (g)	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>
1	150	60	30	53	-3,1
2	150	60	60	105	-3,0
3	1	40	60	-	0.0
4	1	40	120	-	0.0



Tal y como se ha demostrado, la manipulación de las variables operacionales investigadas no permite conseguir mayores reducciones en la desactivación de *A. acidoterrestris* de 5 ciclos logarítmicos. Ello podría deberse a un efecto protector de la crema tal y como se ha apuntado en la introducción. Esta posibilidad se explora a continuación.

### 2.3.4. Efecto del medio

En la Tabla 2.2 se muestra un resumen sobre la desactivación de *A. acidoterrestris* en otros medios aparte de la crema, concretamente, en zumos de manzana y naranja y en agua estéril donde se dispersó el concentrado de esporas de *A. acidoterrestris*. Se especifica el pH de cada uno de estos medios y la forma en que se llevó a cabo la exploración, es decir las condiciones del tratamiento, el modo de operación y la forma de introducción del CO<sub>2</sub>.

**Tabla 2.2.** Resumen de las condiciones, forma de operación y grado de desactivación conseguido en el tratamiento con COAP de *A. acidoterrestris* en distintos medios.

Muestra	Medio	pH	Condiciones inactivación					Forma Introducción CO <sub>2</sub>	Inactivación (log N <sub>0</sub> /N)	Inactivación (log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup> )
			Temperatura (°C)	Presión (bar)	Tiempo (min)	Modo Operación	Velocidad Agitación (rpm)			
1	Zumo de Naranja	--	45	75	2	Continuo	--	Contactador de Membranas	Total	Sims et al, 2002
2	Zumo de Manzana	3,47	65	100	40	Semicontinuo	--	Por el Fondo Directamente	Total	Bae et al, 2009
3	Crema Manzana	3,61	60	100	30	Semicontinuo	500	Por el Fondo Directamente	-4	Nuestro trabajo
4	Crema Manzana	3,68	30	100	30	Semicontinuo	500	Por el Fondo Directamente	-4	Nuestro trabajo
5	Agua Esteril	5,81	30	100	30	Semicontinuo	500	Por el Fondo Directamente	-5	Nuestro trabajo
6	Disolución Ácido Cítrico	3,60	30	100	30	Semicontinuo	500	Por el Fondo Directamente	Total	Nuestro trabajo

En principio, los resultados de desactivación de *A. acidoterrestris* en crema de manzana son inferiores a los obtenidos en zumo de naranja y zumo de manzana. En este último medio, Bae *et al.* (2009), a 65°C y 100 bar consiguieron la desactivación total operando en condiciones parecidas a las de este trabajo (comparar muestras 2 y 3). También se observa que la desactivación es mayor en agua estéril que en la propia crema (comparar muestras 4 y 5). Esta primera comparación induce a concluir que efectivamente hay un efecto protector de la crema. Sin embargo, la composición química de una crema y un zumo no difiere excesivamente. Tan sólo en la proporción de sólidos solubles (en zumo de manzana es 10º Brix y en crema de manzana es 22º Brix) y por tanto en la actividad de agua. Esta diferencia afecta significativamente a la viscosidad. En definitiva, la crema de manzana es mucho más viscosa que los zumos o el agua y ello puede resultar en que el contacto con el CO<sub>2</sub> no sea tan eficaz.

Confirma esta hipótesis que la desactivación total de *A. acidoterrestris* en zumo de naranja, se consiga a tan solo 45°C, 75 bar y 2 min de tratamiento, cuando se opera en continuo y con suministro del CO<sub>2</sub> a través de un contactor de membrana que lo dispersa en finas burbujas de forma muy efectiva (Sims *et al.*, 2002). La importancia de un eficaz contacto también fue demostrado para otras especies. Ishikawa *et al.* (1997) lograron la desactivación total de *Bacillus polymyxa*, *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis* al aplicar el COAP en microburbujas, rebajando así la temperatura para lograrlo a tan sólo 45°C operando a 300 bar. Así que en la siguiente sección se investigó cómo mejorar el contacto en nuestro equipo.

Por otro lado, también se demuestra que el bajo pH de estos medios favorece la desactivación de *A. acidoterrestris*. Basta con comparar los resultados obtenidos en las suspensiones de esporas dispersadas en agua estéril. En la muestra número 6 de la Tabla 2.2 que se acidificó con ácido cítrico a pH similar al de los zumos, la desactivación conseguida fue total. De igual forma, un entorno ácido mejoró la eficacia del tratamiento con COAP en *Clostridium sporogenes* (Haas *et al.*, 1989). Por tanto, tal y como se ha apuntado anteriormente, se demuestra que el bajo pH del medio también es un factor sinérgico al tratamiento del COAP, que explicaría que en medios ácidos, la desactivación de esporas se pueda lograr a temperaturas más bajas que en medios que no lo son.

### **2.3.5. Efecto de las variables que controlan el contacto del CO<sub>2</sub> con la crema**

En esta sección se investigaron dos formas de mejorar el contacto entre el COAP y la crema de manzana, dentro de las posibilidades del equipo experimental. La primera fue aumentar la velocidad de agitación en el recipiente donde se colocaba la crema. La segunda fue aumentar el caudal de CO<sub>2</sub>. Ambas modificaron el Re de agitación, pero el aumento del caudal de CO<sub>2</sub> además afectó a la masa total de CO<sub>2</sub> que contactó con la crema.

En la Tabla 2.3 se presentan los intervalos en que estas variables pudieron ser manipuladas y la influencia que tuvieron en la desactivación de *A. acidoterrestris* en la crema de manzana.

**Tabla 2.3.** Influencia de las variables relacionadas con la eficacia del contacto entre el CO<sub>2</sub> y la crema de manzana, en la desactivación de esporas de *A. acidoterrestris acidoterrestris*. Otras condiciones de operación: presión 150 bar y temperatura 30°C.

Número de muestra	Velocidad de agitación (rpm)	Caudal de CO <sub>2</sub> (g·min <sup>-1</sup> )	Masa de CO <sub>2</sub> (g)	Tiempo de tratamiento (min)	Re	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>
<i>Efecto del aumento de la velocidad de agitación</i>						
1	<b>150</b>	2	60	30	26	-2,2
2	<b>500</b>	2	58	30	45	-3,1
<i>Efecto del aumento del caudal</i>						
3	500	<b>2</b>	58	30	45	-3,1
4	500	<b>4</b>	119	30	89	-4,0
<i>Efecto del aumento de la masa de CO<sub>2</sub></i>						
5	500	4	<b>119</b>	30	89	-4,0
6	500	4	<b>177</b>	45	89	-4,1
7	500	4	<b>243</b>	60	89	-4,1

En primer lugar, se observó que el incremento en la velocidad de agitación mejoró significativamente el grado de desactivación de *A. acidoterrestris* en la crema. Ello fue fundamentalmente consecuencia de un aumento de la turbulencia (Re) que favoreció el contacto.

Se logró también una mejora al duplicar el caudal de CO<sub>2</sub>. Es obvio que esta

medida primeramente generó un aumento de la masa de CO<sub>2</sub> en contacto con la crema. Sin embargo, un aumento de cantidad de CO<sub>2</sub> pasada sobre la crema, solo mejoró la desactivación cuando fue debida a un aumento de la turbulencia (comparar muestras 3 y 4 de la Tabla 2.3), no cuando se consiguió simplemente por aumento del tiempo de tratamiento (comparar muestras 5,6 y 7 de la Tabla 2.3).

### **2.3.6. Efecto del tratamiento con COAP en la calidad de la crema**

La Tabla 2.4 recoge las medidas realizadas en la crema de manzana después de los distintos tratamientos con COAP y térmico (a 1 bar en atmósfera ambiental), en los parámetros sensoriales, reológicos, en el contenido de vitamina C y en el pH. Se utilizaron dos muestras de referencia para hacer las comparaciones. La crema de manzana, tal y como llegó, y la misma, cuando ya estaba contaminada con la suspensión de esporas, es decir la que se introdujo en el recipiente antes de los tratamientos. Las propiedades de estas dos muestras se presentan en las primeras filas de la Tabla 2.4. A continuación se discute las variaciones observadas en cada uno de esos factores.

#### **2.3.6.1. Color**

El cambio de color en las cremas y zumos de frutas es una variable de percepción de calidad para los clientes. Puede atribuirse a varias causas: procesos de oxidación (especialmente del ácido ascórbico), reacciones de Maillard, caramelización y pardeamiento enzimático. Consecuentemente, es un factor que se controla mucho en los procesos de tratamiento de estos productos.

En este trabajo, este parámetro se evaluó de forma cualitativa y por tanto aproximada. Sin embargo, las conclusiones que se pueden deducir son bastante claras. La crema se oscureció al aumentar la temperatura, al aumentar la presión y el tiempo de tratamiento con COAP. A partir de 50°C el cambio de color fue apreciable y ello ocurrió también en las muestras tratadas únicamente con calor (ver Tabla 2.4). Como en esta crema no se detectó presencia de enzimas, dichos cambios deben ser atribuibles a procesos químicos, fundamentalmente reacciones de Maillard, ya que la caramelización tiene lugar generalmente a temperaturas más altas.

De forma similar, se detectó oscurecimiento en otros productos vegetales tales como crema de tomate (Porreta, *et al.* 1994) o peras cortadas (Valverde, *et al.*, 2010), al ser tratados con COAP a 98°C y más de 50°C, respectivamente. Sin embargo Calvo *et al.* (2010), no observaron cambios de color en zumo de naranja tratado a 200 bar y 60°C, ni Zhou *et al.* (2009) en zumo de zanahoria tratado con CO<sub>2</sub> a 25°C y presiones de 100 a 300 bar. Por tanto, parece que el COAP no cambia el color per sé sino que este negativo impacto podría ser debido al uso de condiciones de operación agresivas especialmente altas temperaturas.

De todas formas, como para desactivar el *A. acidoterrestris* no era necesario superar los 30°C ni los 100bar, a esas condiciones, la crema no presentó diferencias de color apreciables en ninguno de los ensayos realizados.

### 2.3.6.2. Vitamina C

La vitamina C se relaciona directamente con la capacidad antioxidante en productos derivados de frutas. Por ello, también tiene una relación directa con el oscurecimiento de la crema a través de procesos oxidativos.

De los datos publicados en la Tabla 2.4 se deduce que todas las muestras tratadas con CO<sub>2</sub> contenían menos cantidad de vitamina C. Al utilizar un método semi-cuantitativo, no es fácil precisar la reducción. Pero sí era generalizado la pérdida de intensidad de la tira reactiva justo al valor inferior (100 mg·l<sup>-1</sup>) al de la crema sin tratar (200 mg·l<sup>-1</sup>). Estos resultados son similares a los encontrados en un estudio previo realizado en pera para investigar el efecto del CO<sub>2</sub> en la desactivación de *Saccharomyces cerevisiae* (Valverde *et al.*, 2010). Aunque es contrario a lo que han visto otros autores en zumo de naranja. Por ejemplo, Fabroni *et al.* (2010) no observaron modificación en el contenido en vitamina C en zumo de naranja operando a 130 bar y 36 °C. Esta discrepancia podría atribuirse simplemente a que en este último trabajo se operó en continuo con periodos de tratamiento mucho menores.

No obstante, el contenido en vitamina C disminuyó también en las muestras tratadas térmicamente por lo que se puede deducir que la reducción del contenido en vitamina C fue debida fundamentalmente a la desnaturalización de la misma por calor.

**Tabla 2.4.** Variables de calidad de la crema de manzana después del tratamiento con CO<sub>2</sub> y del tratamiento térmico (indicados como a presión igual a 1 bar).

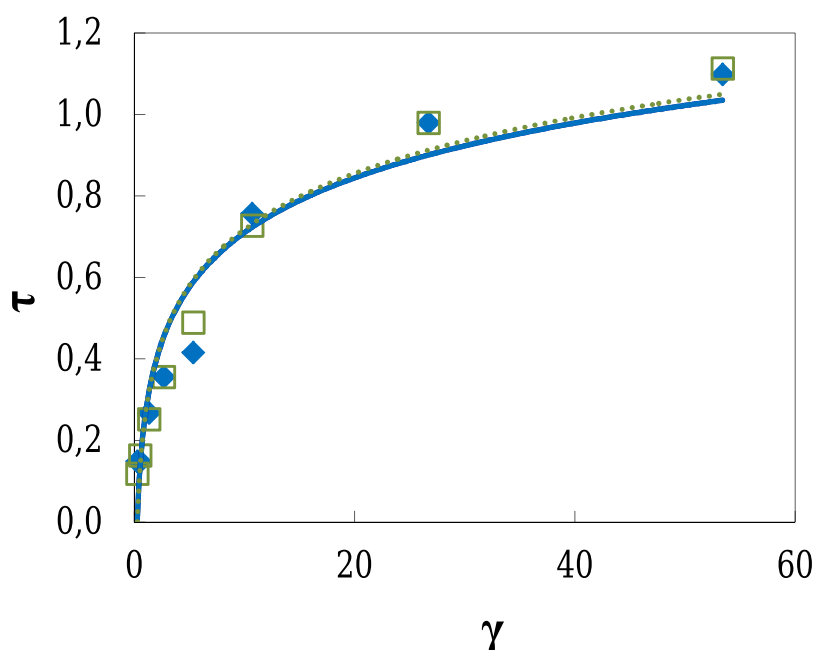
Muestra	P (bar)	T (°C)	t (min)	Color	K	n	pH	Vitamina C (mg·L <sup>-1</sup> )
Crema según se recibió					0,81	0,45	3,84	200
Crema según se recibió+10% A. <i>acidoterrestres</i>					0,56	0,42	3,69	200
<i>Muestras tratadas a presión atmosférica</i>								
1	1	30	60	=	0,53	0,34	3,67	100
2	1	40	60	x	0,68	0,29	3,68	100
3	1	40	120	x	0,55	0,32	3,63	100
4	1	50	60	xx			3,63	100
5	1	60	60	xx	0,53	0,33	3,50	100
6	1	70	60	xx			3,66	100
7	1	80	60	xx			3,71	100
<i>Muestras tratadas con COAP</i>								
8	100	30	30	=	0,54	0,39	3,66	100
9	100	60	30	xx	1,16	0,23	3,36	100
10	100	80	30	xxx	0,58	0,30	3,61	100
11	150	60	30	xx	0,70	0,41	3,74	100
12	150	60	60	xx	0,63	0,37	3,66	100
13	300	60	20	xx	0,68	0,41	3,71	100
14	300	70	60	xxx	0,97	0,21	3,66	100
15	350	45	120	xxx	0,71	0,36	3,65	100

#### 2.3.6.3. Viscosidad

Esta propiedad reológica es importante en las cremas de frutas para su posterior comercialización. De alguna forma, es una medida indirecta de la actividad



enzimática y por supuesto, de la composición y contenido en agua de la misma. En general, las cremas no son fluidos newtonianos, pero sí cumplen la ley de la potencia. Ésta no es una excepción como podemos observar en la Figura 2.3 donde se representa la tensión tangencial frente a la velocidad de deformación. De hecho y debido a que  $n < 1$ , la crema de manzana tiene un comportamiento pseudoplástico.



**Figura 2.3.** Comportamiento reológico de la crema de manzana antes y después del tratamiento con CO<sub>2</sub>. ♦ Crema tratada con CO<sub>2</sub> a 150 bar, 30°C durante 30 minutos, □ Crema sin tratar.

La Figura 2.3 también permite comprobar que dicho comportamiento no es alterado por el tratamiento con COAP si éste se realiza en condiciones suaves. No obstante, si la temperatura aumenta, se van obteniendo valores más bajos de  $n$  y mayores de  $k$  (ver Tabla 2.4). De forma similar, en zumo de tomate tratado a 98°C (y 7000 bar) se observó que la viscosidad aumentaba (Porreta *et al.*, 1994); sin embargo, Zhou *et*

*al.* (2009) no observaron modificaciones en la viscosidad en zumo de zanahoria a condiciones más moderadas (25°C y presiones de 100 a 300 bar). Esto significa que con el incremento de la temperatura al aplicar COAP, aumenta el comportamiento pseudoplástico de la crema porque el agua que contiene queda más ligada a la misma. Ello puede ser debido a alguna modificación en la composición química como lo demuestra el hecho de que también cambia el color. Pero la razón principal es que la crema se deshidrata porque el paso del CO<sub>2</sub> y la aplicación de calor causan que parte del agua se pierda.

#### 2.3.6.4. pH

El pH es una medida de los iones hidrógeno en disolución (correspondiente a la definición química de acidez) y es un parámetro crítico en relación con la expresión de color en derivados de frutas, afecta también al sabor y a la textura. Así, las pulpas de frutas ácidas con pH inferiores a 3,5 forman geles débiles que tienden a colapsarse. La disolución de CO<sub>2</sub> en agua forma ácido carbónico que por ende puede rebajar el pH. Por ejemplo, en zumo de zanahoria se observó disminución del pH, de 6,5 a 4,4 tras el tratamiento con CO<sub>2</sub> a 25°C y presiones de 100 a 300 bar (Zhou, *et al.*, 2009). Sin embargo, tal y como se muestra en la Tabla 2.4, el pH no disminuyó significativamente en ninguna de las muestras de crema de manzana tratadas con COAP, esencialmente porque su pH ya era bajo de partida. De ahí que no se pueda atribuir ningún cambio en los parámetros de calidad asociados a este factor.

## 2.4. CONCLUSIONES

El COAP es eficaz en la desactivación de esporas de *A. acidoterrestris* en crema de manzana. Su aplicación no requiere el uso ni de temperaturas ni de presiones elevadas, puesto que estos parámetros no afectan significativamente el tratamiento. Por ello, el CO<sub>2</sub> puede aplicarse a temperaturas cercanas a la ambiente y a presiones muy moderadas ( $\leq 100$  bar), es decir, a condiciones mucho más suaves que la pasteurización o la alta presión hidrostática, respectivamente. De esta forma, se pueden lograr hasta cuatro reducciones logarítmicas en la concentración de *A. acidoterrestris*, reducción que podría ser suficiente ya que la carga contaminante de esta endospora no suele superar las  $1000 \text{ ufc} \cdot \text{g}^{-1}$  en las cremas que se usan como materias primas en la práctica industrial. A la vez, el CO<sub>2</sub> podría desactivar las enzimas causantes de su deterioro que pudieran estar presentes en la crema, como se ha descrito en la bibliografía (García-Gonzalez *et al.*, 2009 y Damar y Balaban, 2005).

Para mejorar la eficacia del método, la variable realmente importante es el régimen de operación y la forma de poner en contacto el COAP con la crema. En este sentido, la operación fomentando una buena mezcla y dispersión del CO<sub>2</sub> sería el objetivo a conseguir en un escalado para comercialización. Esta medida contribuiría a reducir enormemente los tiempos de tratamiento previsiblemente a pocos minutos, como ya se ha demostrado en zumo de naranja (Sims *et al.*, 2002).

El tratamiento con COAP no afectaría las propiedades sensoriales y reológicas más importantes de la crema de manzana. Aunque habría una ligera reducción del

contenido en vitamina C atribuible a su desnaturalización. Esta pérdida podría ser una de las causas del oscurecimiento de la crema, aunque parece estar más relacionado con reacciones de Maillard. Ambos efectos negativos estarían fundamentalmente relacionados con el uso de temperaturas altas. Por ello, no se producirían en las condiciones mejores de tratamiento con COAP.

Ya hay dos plantas semi-industriales para la pasteurización de zumos desarrolladas por las empresas de gases Praxair y Air Liquid (García-González *et al.*, 2007). Por todas estas razones, el tratamiento con COAP como método de “esterilización” para cremas o zumos de frutas es prometedor y estaría listo para llevar a escala industrial en breve.

## 2.5. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España a través del proyecto ref. CTQ2010-18537 / PPQ.

## 2.6. REFERENCIAS

- Aguado, J. Calles, J.A. Cañizares, P. López, B. Rodríguez, F. Santos, A. Serrano, D., 1999. Ingeniería de la industria alimentaria volumen I conceptos básicos. editorial Síntesis.
- András, C.D., Csajági, C., Orbán, C.K., Albert, C., Ábrahám, B., Miklóssy, I., 2010. A possible explanation of the germicide effect of carbon dioxide in supercritical state based on molecular-biological evidence. *Med. Hypotheses* 74, 325–329.

- Bae, Y.Y., Lee, H.J., Kim, S.A., Rhee, M.S., 2009. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice by supercritical carbon dioxide. *Int. J. Food Microbiol.* 136, 95–100.
- Ballestra, P., Cuq, J.-L., 1998. Influence of Pressurized Carbon Dioxide on the Thermal Inactivation of Bacterial and Fungal Spores. *LWT - Food Sci. Technol.* 31, 84–88.
- Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., Corbo, M.R., 2008. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: New methods for inhibiting spore germination. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 103–110.
- Buzrul, S., Alpas, H., Bozoglu, F., 2005. Use of Weibull frequency distribution model to describe the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by high pressure at different temperatures. *Food Res. Int.* 38, 151–157.
- Calvo, L., Muguerza, B., Cienfuegos-Jovellanos, E., 2007. Microbial inactivation and butter extraction in a cocoa derivative using high pressure CO<sub>2</sub>. *J. Supercrit. Fluids* 42, 80–87.
- Calvo, L., Torres, E., 2010. Microbial inactivation of paprika using high-pressure CO<sub>2</sub>. *J. Supercrit. Fluids* 52, 134–141.
- Damar, S., Balaban, M.O., 2006. Review of Dense Phase CO<sub>2</sub> Technology: Microbial and Enzyme Inactivation, and Effects on Food Quality. *J. Food Sci.* 71, R1–R11.
- Fabroni, S., Amenta, M., Timpanaro, N., Rapisarda, P., 2010. Supercritical carbon dioxide-treated blood orange juice as a new product in the fresh fruit juice market. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11, 477–484.
- Finley, N., Fields, M.L., 1962. Heat Activation and Heat-induced Dormancy of *Bacillus stearothermophilus* Spores. *Appl. Envir. Microbiol.* 10, 231–236.

- Furukawa, S., Watanabe, T., Tai, T., Hirata, J., Narisawa, N., Kawarai, T., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2004. Effect of high pressure gaseous carbon dioxide on the germination of bacterial spores. *Int. J. Food Microbiol.* 91, 209–213.
- Furukawa, S., Watanabe, T., Koyama, T., Hirata, J., Narisawa, N., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2009. Inactivation of food poisoning bacteria and *Geobacillus stearothermophilus* spores by high pressure carbon dioxide treatment. *Food Control* 20, 53–58.
- Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A.H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J.F., Devlieghere, F., 2007. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 1–28.
- Groenewald, W., Gouws, P., Witthuhn, R., 2009. Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. *Food Microbiol.* 26, 71–76.
- Haas, G.J., Prescott, H.E., Dudley, E., Dik, R., Hintlian, C., Keane, L., 1989. Inactivation of microorganisms by carbon dioxide under pressure. *J. Food Saf.* 9, 253–265.
- Ishikawa, H., Shimoda, M., Tamaya, K., Yonekura, A., Kawano, T., Osajima, Y., 1997. Inactivation of *Bacillus* Spores by the Supercritical Carbon Dioxide Micro-bubble Method. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 1022–1023.
- Lee, S.-Y., Dougherty, R.H., Kang, D.-H., 2002. Inhibitory Effects of High Pressure and Heat on *Alicyclobacillus acidoterrestris* Spores in Apple Juice. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4158–4161.
- Levinson, H.S., Hyatt, M.T., 1970. Effects of Temperature on Activation, Germination, and Outgrowth of *Bacillus megaterium* Spores. *J. Bacteriol.* 101, 58–64.

- Matthews, M.A. Zhang, J. Fox, K. Drews M.J. LaBerge, M. An, Y., 2006. Mechanisms of supercritical carbon dioxide sterilization of bacterial spores. International Symposium on Supercritical Fluids. Paper 241.
- McCabe, W. L. Smith, J. C. Harriot, P., 2002. No Title, Operaciones unitarias en Ingeniería Química. McGraw Hill.
- McKnight, I.C., Eiroa, M.N.U., Sant'Ana, A.S., Massaguer, P.R., 2010. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in pasteurized exotic Brazilian fruit juices: Isolation, genotypic characterization and heat resistance. Food Microbiol. 27, 1016–1022.
- Norton, T., Sun, D.-W., 2008. Recent Advances in the Use of High Pressure as an Effective Processing Technique in the Food Industry. Food Bioprocess Technol. 1, 2–34.
- Porretta, S., Birzi, A., Ghizzoni, C., Vicini, E., 1995. Effects of ultra-high hydrostatic pressure treatments on the quality of tomato juice. Food Chem. 52, 35–41.
- Rajan, S., Pandrangi, S., Balasubramaniam, V.M., Yousef, A.E., 2006. Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores in egg patties by pressure-assisted thermal processing. LWT - Food Sci. Technol. 39, 844–851.
- Shieh, E., Paszczynski, A., Wai, C.M., Lang, Q., Crawford, R.L., 2009. Sterilization of *Bacillus pumilus* spores using supercritical fluid carbon dioxide containing various modifier solutions. J. Microbiol. Methods 76, 247–252.
- Shimoda, M., Kago, H., Kojima, N., Miyake, M., Osajima, Y., Hayakawa, I., 2002. Accelerated Death Kinetics of *Aspergillus niger* Spores under High-Pressure Carbonation. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4162–4167.

- Sims, M. Estigarribia, E., 2002. Continuous sterilization of aqueous pumpable food using high pressure carbon dioxide. 4th international symposium on high pressure process technology and chemical engineering.
- Spilimbergo, S., Bertucco, A., Lauro, F.M., Bertoloni, G., 2003. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by supercritical CO<sub>2</sub> treatment. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 4, 161–165.
- Valverde, M.T., Marín-Iniesta, F., Calvo, L., 2010. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in conference pear with high pressure carbon dioxide and effects on pear quality. *J. Food Eng.* 98, 421–428.
- Watanabe, T., Furukawa, S., Tai, T., Hirata, J., Narisawa, N., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2003 a. High Pressure Carbon Dioxide Decreases the Heat Tolerance of the Bacterial Spores. *Food Sci. Technol. Res.* 9, 342–344.
- Watanabe, T., Furukawa, S., Hirata, J., Koyama, T., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2003 b. Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* Spores by High-Pressure Carbon Dioxide Treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7124–7129.
- Zhou, L., Wang, Y., Hu, X., Wu, J., Liao, X., 2009. Effect of high pressure carbon dioxide on the quality of carrot juice. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 10, 321–327.





### **3. INACTIVACIÓN DE ESPORAS DE *Bacillus cereus*** **EN SUSPENSIÓN ACUOSA Y EN PIMENTÓN**



### 3.1. INTRODUCCIÓN

El pimentón es una especia que se hace moliendo variedades de pimiento rojo seleccionadas y secadas del género *Capsicum*. Se utiliza como ingrediente para proporcionar color, olor y sabor al arroz, guisos y sopas, y en la preparación de embutidos. Más allá de sus cualidades organolépticas únicas, el pimentón es conocido por ser una fuente significativa de microorganismos, que resultan de la contaminación microbiana que se produce como resultado de las pobres condiciones sanitarias que están presentes durante su producción (McKee, 1995). Por otra parte, la descontaminación del pimentón es un reto porque los microorganismos se han adaptado a la naturaleza del producto (baja actividad de agua) mediante la formación de esporas (Staack *et al.*, 2008). Una de las bacterias formadoras de esporas más frecuentemente encontradas en pimentón es *Bacillus cereus*, (McKee, 1995), que puede causar náuseas, vómitos y diarrea. Otras bacterias que pueden estar presentes en el pimentón son *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli*, así como algunas otras especies del *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Klebsiella* y géneros *Serratia* (Fernández-Trujillo y Escarabajal, 2006).

Como consecuencia de ello, y antes de su comercialización, la carga microbiana de pimentón debe ser controlada dentro de los límites establecidos en la Recomendación de la Comisión Europea de 19 de diciembre de 2003 (documento número C [2003] 4878). Por lo tanto, *B. cereus* y *C. perfringens* deben estar por debajo de los recuentos de  $10^5$  y  $10^3$  unidades formadoras de colonias por gramo (ufc g<sup>-1</sup>), respectivamente. Además, el recuento total de enterobacterias debe estar

por debajo de 10 ufc g<sup>-1</sup>; mientras que *Salmonella* debe estar ausente en una muestra de 25 g.

Las esporas son la forma más resistente de las bacterias; su estructura es diferente y más compleja en comparación con las células vegetativas. Parte de su resistencia se debe a la presencia de una capa de proteína externa, como se ha indicado en la introducción, sección 1.3.; por lo tanto, pueden sobrevivir en condiciones extremas, como niveles de pH altos y bajos, altas y bajas temperaturas y alta presión hidrostática, y pueden soportar estas condiciones durante varios años (Black *et al.*, 2007).

Se encuentran en el suelo y son una fuente de contaminación en frutas, verduras, especies, etc. Una vez que llegan a la comida, en presencia de nutrientes y agua, germinan a la forma vegetativa, causando enfermedades. Debido a su alta resistencia a la temperatura, se debe utilizar vapor de agua a 120-160°C durante 20-30 minutos para inactivarlas. Pero este tratamiento térmico provoca pérdida de propiedades nutricionales y organolépticas en los alimentos.

La desinfección de pimentón se consigue tradicionalmente a través de la aplicación de vapor de agua a 90 a 120 °C. Sin embargo, algunos clientes exigen mucho más altos grados de inactivación, que sólo se puede lograr mediante el uso de vapor a 7 bar y 165 °C durante 20-30 min, un proceso que conduce a una pérdida de color y aroma, y a una reducción en la estabilidad, lo que reduce en última instancia, su valor comercial (Fernández-Trujillo y Escarabajal, 2006).

Por lo tanto, es de gran interés para la industria, encontrar métodos de destruir las esporas bacterianas en los alimentos deshidratados usando métodos no térmicos. Una posibilidad es la aplicación de CO<sub>2</sub> a alta presión (COAP).

Concretamente, la inactivación de esporas de *B. cereus* mediante COAP fue investigada en agua en condiciones concretas de presión y temperatura que están resumidas en la Tabla 1.2. de la introducción. Por ejemplo, Watanabe *et al.* (2003) a lograron 1,2 reducciones a 300 bar, 35 °C y 120 min. Dillow *et al.* (1999) lograron mejores resultados (5 reducciones logarítmicas) a temperatura mayor de 60 °C en 20 minutos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de las principales variables de la inactivación con CO<sub>2</sub> en esporas de *B. cereus* por ser la más importante contaminación de especias alimentarias y más concretamente de pimentón. Los resultados se compararon con el grado de inactivación obtenido a similares condiciones de la microbiota natural de pimentón, que fue publicada anteriormente por el mismo grupo de investigación (Calvo y Torres, 2010).

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1. Materiales**

El pimentón en polvo, que tiene un tamaño medio de partículas de menos de 0,5 mm, con un contenido de humedad de  $9,4 \pm 0,5\%$ , fue proporcionado por el Centro Tecnológico Español de Conservación de Alimentos. El polvo se almacenó a

temperatura ambiente en un matraz cerrado y opaco para evitar su deterioro durante la investigación. El dióxido de carbono líquido presurizado a su presión de vapor (aproximadamente 50 bar), 99,998% de pureza, fue proporcionado por Air Products, España. El monóxido de dinitrógeno (N<sub>2</sub>O) también fue suministrado por Air Products, España. Los medios de cultivo fueron suministrados por Scharlau Chemie SA, distribuido por Scharlab, SL, España. La cepa utilizada fue *B. cereus* (CECT 148, ATCC 14579; CIP 66.24; DSMZ 31; LMG 6923) de la Colección española de Cultivos Tipo.

### **3.2.2. Análisis microbiano del pimentón**

Para la determinación de la contaminación microbiana inicial del pimentón, se añadieron cinco gramos a 45 ml de agua desionizada en condiciones estériles. Se prepararon diluciones en serie, y 0,1 ml se sembraron en placas de Petri que contenían recuento en placa agar (PCA) y se incubaron a 30 °C durante 48 h. La contaminación inicial de *B. cereus* se determinó en agar selectivo de *Bacillus cereus* cultivado a 37 °C durante 24 h; mientras que la contaminación por *Clostridium* se determinó en agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS) cultivado en jarra de anaerobiosis a 37 °C durante 48 h.

### **3.2.3. Generación y concentración de esporas de *B. cereus***

Una alícuota de 0,1 ml del cultivo se extendió sobre la superficie de placas de Petri que contenían el medio específico y 0,1 g l<sup>-1</sup> Mn (MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) y se incubó en estufa durante 2 días a 45°C. Después de este período las superficies de las placas se

lavaron dos veces en dos porciones de 7,5 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Después de cada lavado, un portaobjetos de microscopio estéril fue arrastrado a través de la superficie de la placa para recoger las esporas que se habían formado. Se recogió el agua y se centrifugó durante 10 min a 10.000 rpm; a continuación, se eliminó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en agua destilada estéril, y se sometió a un tratamiento térmico (90 °C durante 15 min) para inactivar cualquier formas vegetativas que pudieran permanecer en suspensión, lo que dio como resultado una concentración de 10<sup>8</sup> esporas viables ml<sup>-1</sup>. Se diluyó hasta alcanzar una concentración de 10<sup>6</sup> esporas ml<sup>-1</sup> tanto para los ensayos en agua como para los ensayos en aceite.

#### **3.2.4. Determinación del grado de inactivación**

El grado de inactivación se indica como el logaritmo de la relación entre el recuento en placa agar de UFC por ml o g después del tratamiento (N) respecto de antes del tratamiento (N<sub>0</sub>). La desviación estándar de las lecturas fue de ± 0,3 log.

#### **3.2.5. Determinación del pH**

El pH se midió durante el tratamiento utilizando tiras reactivas de dos intervalos de pH (Merck, España) introducidas en el recipiente: 4,0-7,0 y 2,5 a 4,5.

#### **3.2.6. Inactivación microbiana mediante COAP**

Se utilizaron dos instalaciones diferentes para operar. Para la operación en

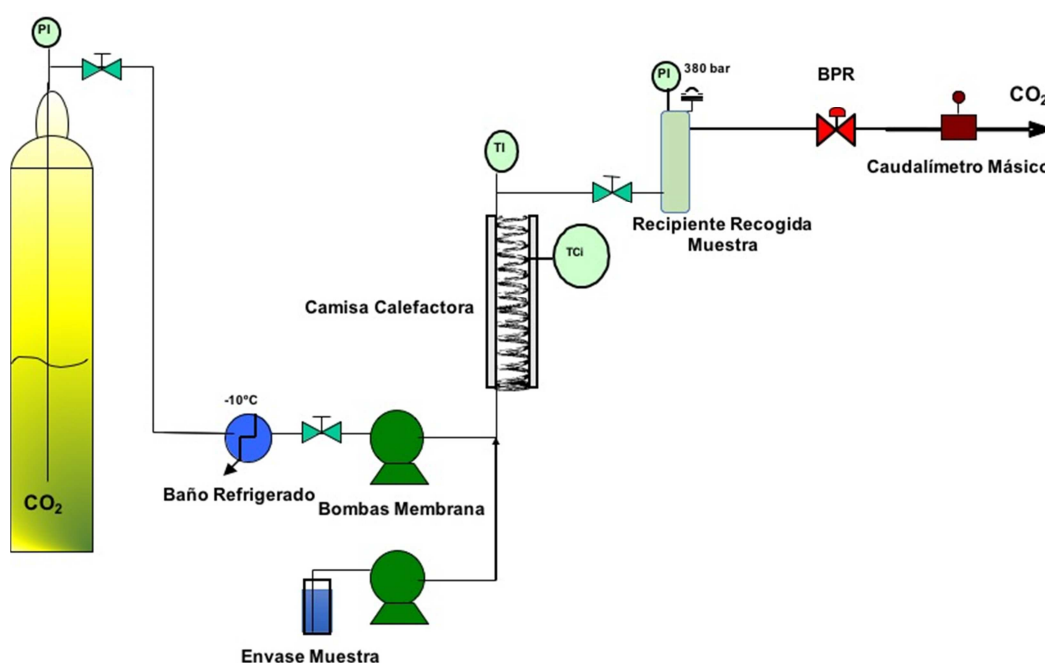


discontinuo y en semicontinuo (con respecto al flujo de CO<sub>2</sub>) se utilizó el mismo equipo mostrado en la Figura 2.1, descrito en la sección 2.2.7., que consiste en una línea de alimentación de CO<sub>2</sub> y un recipiente 316 de acero inoxidable de 50 ml de capacidad.

El recipiente se cargó con 20 ml de la suspensión de esporas y se transfirió al equipo de alta presión en condiciones estériles. Después se ajustaron los cierres, se conectó la camisa de calentamiento. Entonces, se abrió la botella de CO<sub>2</sub> y se conectó la bomba para alcanzar la presión de trabajo. El agitador se conectó a 500 rpm y la válvula de BPR se abrió para iniciar el flujo. El CO<sub>2</sub> entró por el fondo del recipiente y pasó sobre la suspensión de esporas. Cuando se alcanzó el final del tiempo de operación, la bomba se apagó, se cortó el suministro de CO<sub>2</sub> y comenzó la despresurización muy lentamente con el fin de evitar la congelación de la muestra. Típicamente, el tiempo requerido para que se alcanzase la temperatura de funcionamiento y la presión fue de 5 min, y el tiempo de despresurización fue de 12 min. Una vez despresurizado y separado del equipo, el recipiente con la muestra tratada se llevó a la cámara de flujo laminar estéril para los análisis microbiológicos posteriores. Cuando se trabajó con N<sub>2</sub>O, se operó de la misma manera, pero utilizando con suministro este gas. El mismo equipo se utilizó para la operación en discontinuo, pero sin flujo de CO<sub>2</sub>.

La Figura 3.1 muestra el montaje experimental para las pruebas en continuo. El CO<sub>2</sub> se suministró en forma líquida. Se hizo pasar por un baño controlado térmicamente (Selecta, FRIGITERM-30, España) y se enfrió a -15 ° C antes de llegar a una bomba de émbolo de HPLC (Jasco, PU 2800, Japón). El enfriamiento

de CO<sub>2</sub> impidió la cavitación durante la presurización. La suspensión de esporas líquida se suministró de un recipiente cerrado con otra bomba similar. El caudal de CO<sub>2</sub> fue diez veces mayor que el de la suspensión. Ambas corrientes se mezclaron en una T y entraron en un reactor tubular de 1/8 ", que fue construido en varias longitudes (70, 170, 580, 1000 cm) para aumentar el tiempo de contacto. La temperatura se leyó a la salida de un termopar tipo K con  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  de precisión. La presión se leyó en un barómetro Bourbon con una precisión de 2 bar. La instalación tenía un disco de ruptura a 380 bar para evitar la sobrepresión. La corriente líquida tratada se recogió en un recipiente mientras que el CO<sub>2</sub> salió por una BPR (Tescom, 26 - 1761 - 24 - 161, Alemania), donde la presión se redujo a condiciones atmosféricas. A continuación, el CO<sub>2</sub> se convirtió en gas y salió de la instalación. La masa total y el caudal de CO<sub>2</sub> se midió utilizando un caudalímetro másico (Alicat Scientific, M-10SLPM-D, USA) conectado a la salida.



**Figura 3.1.**Equipo de tratamiento con COAP en operación en continuo.

### 3.2.7. Tratamiento térmico de inactivación sin CO<sub>2</sub>

Los tratamientos térmicos se realizaron para comparar el efecto por separado del calor en la inactivación microbiana. En estos experimentos, el procedimiento fue en gran parte igual, excepto que no se introdujo CO<sub>2</sub> en el recipiente. En su lugar, la muestra se mantuvo dentro del recipiente con la camisa calefactora conectada a la temperatura objetivo durante el mismo tiempo que las pruebas comparativas con CO<sub>2</sub>.

### 3.2.8. Análisis estadístico

Los experimentos se repitieron al menos tres veces. Los análisis microbianos se realizaron por duplicado para cada réplica ( $n = 3 \times 2$ ). Se calcularon las medias y las desviaciones estándar para todos los datos.

## 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El recuento de aerobios totales en PCA del pimentón fue de  $9,2 \cdot 10^5 \pm 1,8 \cdot 10^5$  ufc g<sup>-1</sup>. Una contribución importante a la carga microbiana correspondió a microorganismos esporulados debido a que el recuento de PCA después de someter las suspensiones de células a 80°C durante 15 min fue  $4,6 \cdot 10^5 \pm 9,4 \cdot 10^4$  ufc g<sup>-1</sup>, que era 50% del recuento total inicial. Correspondieron fundamentalmente a esporas de *B. cereus* dado que el recuento en agar selectivo fue de  $3,1 \cdot 10^5 \pm 9,4 \cdot 10^4$  ufc g<sup>-1</sup>, lo que equivalía a 34% del recuento total. Se observaron algunas colonias negras de *Clostridium* en agar SPS ( $<30$  ufc g<sup>-1</sup>).

A continuación se muestran los resultados del uso de COAP en la inactivación de esporas de *B. cereus* por ser el principal y más resistente contaminante de pimentón. Se describe el impacto que tuvieron los parámetros de operación en la inactivación de estas esporas en medio acuoso y se compararon con los resultados obtenidos previamente en pimentón (Calvo y Torres, 2010).

### 3.3.1. Impacto de la temperatura

En general, se logra mayor inactivación de las formas esporulados cuando se aumenta la temperatura. Así, la inactivación de las esporas de *B. cereus* en agua fue progresiva con la temperatura, como se observa en la Figura 3.2 a, pero la inactivación total no se logró hasta 80°C después de la exposición a COAP a 300 bar durante 45 min. Dillow *et al.* (1999) reportó la eliminación total de esta espora a 60°C y 205 bar, pero después de seis ciclos de 240 min. Ballestra y Cuq (1998) en condiciones similares obtuvieron 4 reducciones logarítmicas en *B. subtilis*.

Por otro lado, cuando se compararon estos resultados con los obtenidos a partir del tratamiento térmico, se encontró que el COAP tenía efecto letal por sí mismo. Por ejemplo, a 60°C, con el tratamiento térmico sólo, no hubo inactivación de la espora de *B. cereus*, mientras que con el tratamiento con COAP a 300 bar, se redujo el recuento de esta espora en dos órdenes de magnitud. Este hecho fue publicado previamente por otros autores (Spilimbergo *et al.*, 2003 y Watanabe *et al.*, 2003 a). Watanabe *et al.*, 2003a mostraron la sensibilidad al CO<sub>2</sub> de cinco esporas del genero *Bacillus*, en todas ellas se observó una mayor inactivación cuando fueron expuestas a CO<sub>2</sub> a la misma temperatura, aunque también se observó que no todas

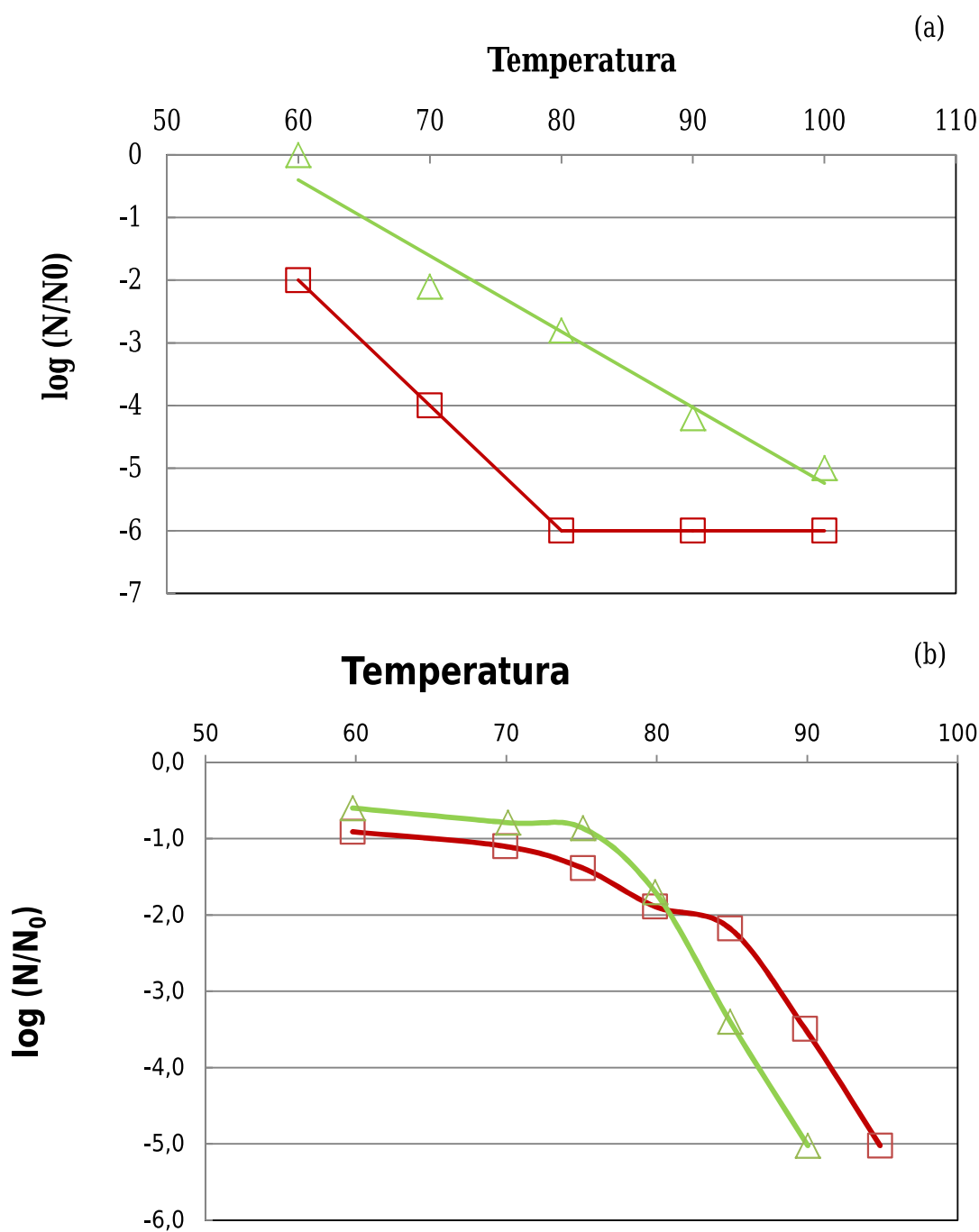
ellas tenían la misma resistencia al CO<sub>2</sub> siendo *B. subtilis* la que tenía una mayor resistencia y *B. cereus* la que menos. Así mismo, Spilimbergo *et al.* (2003) consiguieron desactivación total de *B. subtilis* en 2 horas a solo 75°C y 70 bar cuando a esa misma temperatura sin CO<sub>2</sub> no consiguieron ningún efecto.

Por el contrario, al comparar el efecto de la temperatura en ambos tratamientos COAP y calor en el medio sólido (pimentón) donde la actividad del agua era baja, no se observaron diferencias significativas en la inactivación del recuento total de microorganismos aerobios (formado principalmente por *B. cereus*), como se muestra en la Figura 3.2 b (Calvo y Torres, 2010).

Por otra parte, la reducción logarítmica del recuento no siguió una dependencia lineal con la temperatura. La primera etapa, hasta 80°C, correspondió a la activación térmica, donde la letalidad de los ambos tratamientos fue similar. En la segunda etapa, a partir de esta temperatura, la dependencia de la temperatura de inactivación del tratamiento COAP fue superior.

Por consiguiente, la influencia de la temperatura está muy relacionada con el medio. La diferencia está vinculada principalmente a la humedad. En el agua, el efecto esporicida significativamente mayor del COAP se atribuyó a su capacidad para inducir la germinación de esporas (Spilimbergo *et al.*, 2003, Furukawa *et al.*, 2004) de modo que la tolerancia al calor de las esporas bacterianas se redujo (Watanabe, *et al.*, 2003 b). Creemos que esto está fuertemente ligado a la reducción del pH del agua por la disolución de CO<sub>2</sub>, como se demuestra más adelante. En ausencia de agua, ninguno de los dos efectos son posibles. En consecuencia, en los medios

deshidratados no se encuentra un efecto esporicida separado del CO<sub>2</sub> como se demostró para el pimentón (Calvo y Torres, 2010).

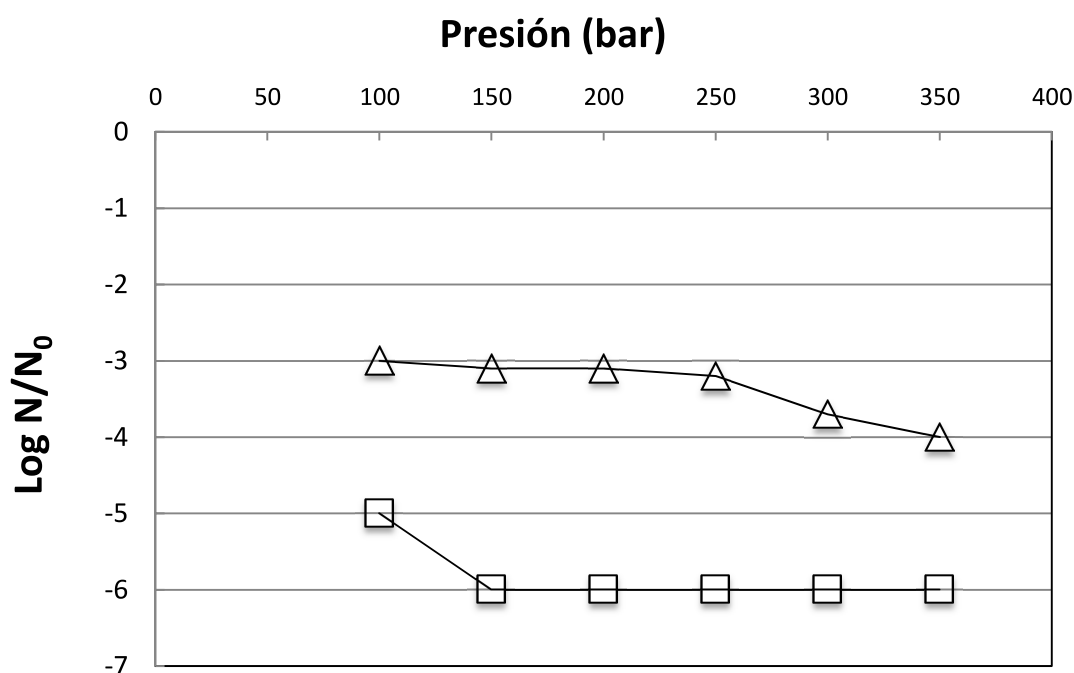


**Figura 3.2.** Comparación entre el tratamiento térmico (Δ) y con COAP a 300 bar (□) en la inactivación de (a) esporas de *B. cereus* en agua estéril (b) y en pimentón (Calvo y Torres, 2010) después de un tiempo de contacto de 45 minutos.

### 3.3.2. Impacto de la presión de operación

La inactivación de las esporas de *B. cereus* suspendidas en agua a crecientes presiones de aplicación de COAP se muestra en la Figura 3.3, a dos temperaturas distintas, 70 y 85 °C, respectivamente.

Como se puede observar, hay una reducción logarítmica en el grado de inactivación en el intervalo estudiado en ambas temperaturas. A 70 °C pasa de 3 a 4 reducciones entre 100 y 350 bar mientras que a 80 °C el efecto de la presión se ve antes, al aumentar de 100 a 150 bar, pero después no se puede saber si hay un impacto mayor porque ya se logra la inactivación total.



**Figura 3.3.** Inactivación de esporas de *B. cereus* suspendidas en agua mediante COAP a crecientes valores de presión operando a dos temperaturas distintas 70 °C ( $\Delta$ ) y 85°C ( $\square$ ).

También Bae *et al.* (2009) encontraron una diferencia en la inactivación de *A. acidoterrestris* esporas en el zumo de manzana entre 80 y 120 bar a 65°C. Algunos autores relacionaron el impacto de la presión con el estado de CO<sub>2</sub> (Enomoto *et al.*, 1997, Dillow *et al.*, 1999, Furukawa *et al.*, 2004, Spilimbergo *et al.*, 2003). Sin embargo, Shimoda y colaboradores demostraron que a niveles de carbonatación similares, la influencia de la presión (40-200 bar) era nula en la inactivación de esporas de *Aspergillus niger* (Shimoda *et al.*, 2002).

Por el contrario, en los medios con baja actividad de agua, no hay diferencias importantes en la inactivación de la carga natural con la presión. Así, en la microbiota de pimentón, solo se encontró un log de reducción entre 60 y 350 bar (Calvo y Torres, 2010). En este trabajo, también se demostró que tampoco es eficaz la aplicación de ciclos de presión.

Estos hechos se podrían explicar por varias razones. Por un lado, se deben utilizar valores muy altos de presión hidrostática para matar las esporas. En concreto, más de 8.000 bar se requiere para eliminar las esporas *Bacilliae* (Norton y Sun, 2008). Por otra parte, es dudoso que el COAP pueda disolver cualquier componente del exosporium de la endospora ya que está hecho de proteínas de muy baja solubilidad en este medio.

Por lo tanto, parece que la influencia positiva de la presión en sistemas líquidos está ligada principalmente a la mejora de la disolución de CO<sub>2</sub> con la consiguiente reducción de pH, como se discute a continuación.



### 3.3.3. Efecto del pH externo

La disolución del  $\text{CO}_2$  en el agua produce ácido carbónico que reduce el pH. Mediante la introducción de tiras de pH en el recipiente, se determinó que en estos ensayos este valor fue osciló entre 3,7 y 3,9. La Tabla 3.1 muestra que esta acidez promovió la inactivación de las esporas de *B. cereus* en suspensión acuosa. De manera similar, un ambiente ácido mejoró la eficacia de COAP en la inactivación de esporas de *Clostridium sporogenes* (Haas *et al.*, 1989) y *A. acidoterrestris* como se ha demostrado en el capítulo anterior y publicado en Casas *et al.* (2012). Contrariamente, la inactivación alcanzada por COAP fue casi insignificante cuando las esporas se suspendieron en una solución tamponada con fosfato. Por otra parte, la aplicación de  $\text{N}_2\text{O}$  en mismas condiciones no fue tan eficaz como el  $\text{CO}_2$ , probablemente porque este gas no acidificó el medio de partida. Tampoco se logró la inactivación de las esporas cuando se calentaron a la misma temperatura en una disolución de ácido cítrico con pH incluso más bajo al alcanzado en los tratamientos con  $\text{CO}_2$ .

**Tabla 3.1.** Impacto de pH del medio sobre la inactivación de esporas de *B. cereus* en solución acuosa bajo diferentes tratamientos durante 60 min. El pH inicial de la suspensión era de 4,5.

Medio	Tratamiento	pH	$\text{Log } \frac{N}{N_0} \cdot \text{min}^{-1}$
Agua	$\text{CO}_2$ a 300 bar y 70°C	3,8	-4,1
Agua	$\text{N}_2\text{O}$ a 300 bar y 70°C	4,5	-1,2
Tampón fosfato	$\text{CO}_2$ a 300 bar y 70°C	7,0	0,0
Agua acidificada (con ácido cítrico)	Tratamiento térmico a 70°C y presión atmosférica	3,5	0,0

Por lo tanto, un entorno de pH bajo es un factor sinérgico en el tratamiento de COAP. Así, se demostró que una vez que se germinan las esporas, un medio de bajo pH puede inhibir su excrecencia para reiniciar el metabolismo y el crecimiento normal (Russel *et al.*, 1999, McDonnell, 2007). Concretamente, una disminución del pH del medio reprimió el crecimiento de esporas de *B. cereus* (Quintavalla *et al.*, 1993) y disminuyó su resistencia a la inactivación (Leguerinel *et al.*, 2005). En los medios de baja  $a_w$ , el  $\text{CO}_2$  no sería capaz de reducir el pH externo, lo que dificulta la posibilidad de estos beneficiosos mecanismos.

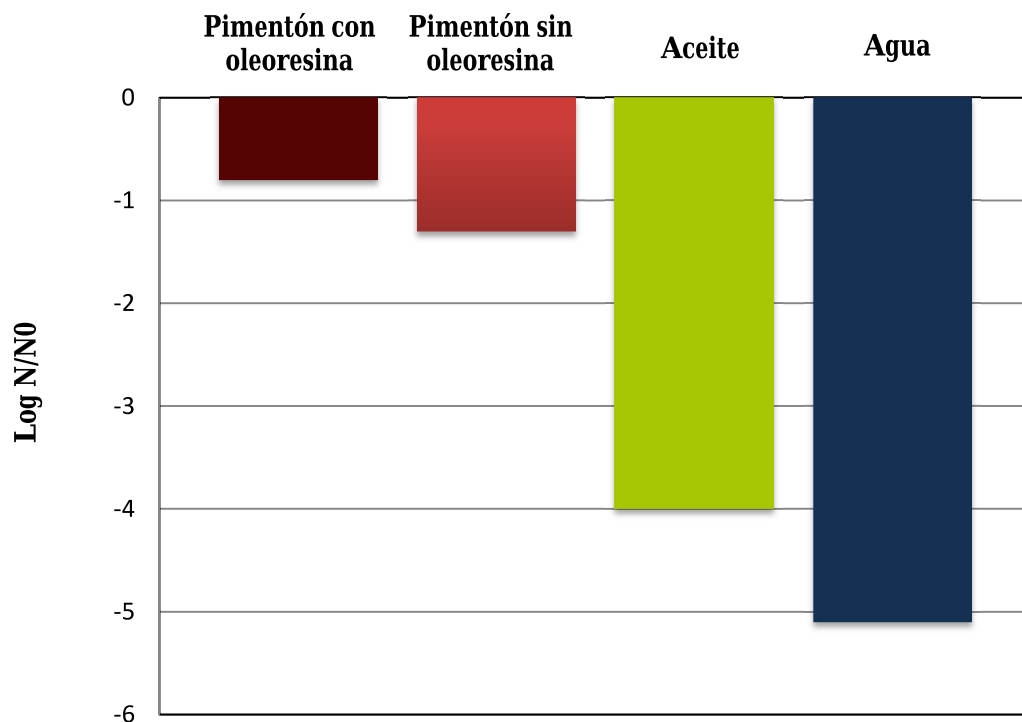
### 3.3.4. Efecto de la composición del medio

En la Figura 3.4 se muestra una comparación de la inactivación de las esporas de *B. cereus* suspendidas en agua y en aceite de oliva a 60 bar y 80°C. También se muestra la comparación de la inactivación de la microbiota natural de pimentón con y sin oleorresina a las mismas condiciones, tal y como se publicó previamente (Calvo y Torres, 2010).

Como se observa, la presencia de grasa obstaculiza la inactivación de las esporas en ambos medios, líquido y sólido. Dos posibles razones podrían explicar este resultado. Bien la grasa podría haber proporcionado una capa protectora que impidiera el contacto con el  $\text{CO}_2$ , bien la fracción lipídica podría haber tamponado la reducción del pH.

Asimismo, Furukawa y colaboradores observaron que la presencia de sales y azúcares en el medio redujo la eficacia del tratamiento con  $\text{CO}_2$  (Furukawa *et al.*,

2009). Este impacto negativo fue proporcional a su concentración, probablemente debido a la menor actividad de agua que generó la presencia de estas sustancias.



**Figura 3.4.** Influencia de la grasa en la inactivación de la biocarga natural del pimentón (Calvo y Torres, 2010) y en esporas de *B. cereus* tratados por COAP a 60 bar, 80 °C y 45 min de tiempo de contacto.

Quizá sea ésta una de las razones por las cuales no se encontró ningún grado de inactivación de esporas de *B. cereus* inoculadas en leche cruda operando a 40 °C y 483 bar incluso con elevados grados de carbonatación de 132 g kg<sup>-1</sup> (Werner *et al.*, 2006).

### 3.3.5. Impacto del modo de operación y el tiempo de contacto

Es obvio que cuanto más tiempo de tratamiento COAP, mayor nivel se obtiene de inactivación de esporas (Furukawa *et al.*, 2004). Concretamente, Dillow *et al.*

(1999) en esporas de *B. cereus* consiguieron una reducción de cinco ciclos logarítmicos operando a 60°C, pero después de dos horas de tratamiento. Mientras que Enonomoto *et al.* (1997) consiguieron a esa misma temperatura, siete reducciones logarítmicas después de 300 horas a 59 bar.

Sin embargo, si el método pretende ser competitivo con la tecnología de conservación térmica convencional, la duración debe ser inferior a una hora. Esto depende enormemente del modo de operación como demostró Spilimbergo *et al.* (2002) en la inactivación de *B. subtilis*.

Por esta razón, en esta parte del trabajo se exploró las distintas posibles formas de operar: en discontinuo, semicontinuo y continuo. En la operación en discontinuo se cargó el esterilizador con 20 ml de la suspensión de esporas, se llenó con CO<sub>2</sub> hasta la presión y temperatura y se dejó durante 60 minutos, la operación en semicontinuo se llevó a cabo del mismo modo pero se permitió el paso de CO<sub>2</sub> a la presión y temperatura de estudio durante 45 minutos. En continuo, se bombearon el CO<sub>2</sub> y la suspensión de esporas paralelamente, se unieron en una T y se pasaron por el serpentín de distintas medidas para variar el tiempo de contacto. La operación en discontinuo sería similar al autoclavado en esterilización térmica. La operación en continuo simula la esterilización con contacto continuo de vapor. Los resultados de estos ensayos comparativos se muestran en la Tabla 3.2.

Otros autores demostraron la gran mejoría del tratamiento en discontinuo cuando el CO<sub>2</sub> se introdujo en micro-burbujas. Así Osajima *et al.* (1997) consiguieron la

inactivación total de *B. cereus* a tan solo 300 bar y 50°C durante 80 minutos. Estos resultados también se han incluido en la Tabla 3.2 por motivos comparativos.

**Tabla 3.2.** Impacto del modo de operación, el tiempo de contacto y la turbulencia en la inactivación de esporas de *B. cereus* por COAP a 300 bar y 70°C. En los ensayos discontinuos y semicontínuos, se muestra el número Re de agitación provocado por agitación a 500 rpm. Para la prueba continua se utilizó el número de Re por el interior de conducciones.

Modo operación	Tiempo operación (min)	Tiempo contacto (min)	Re	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>
Discontinuo	60	60	0,7	-2,3
*Discontinuo con microburbujas	80	80	-	-6,0
Semicontínuo	45	45	0,7	-4,0
	60	60	0,7	-4,2
Continuo	-	1	89,1	-2,1
	-	3	89,1	-2,1
	-	9	89,1	-3,4
	-	15	89,1	-4,2

\*(Osajima *et al.*, 1997) a 60°C y 300 bar.

Por tanto, para líquidos y grandes producciones, sería mejor operar en continuo con una configuración similar a la propuesta. De hecho, existen ya varias plantas piloto que hoy operan así. Praxair desarrolló una planta piloto para la pasteurización de alimentos líquidos, que se ha testado en zumo de naranja, cerveza, leche, sidra etc. Está descrita brevemente en Kincal *et al.* (2005). Las corrientes de CO<sub>2</sub> y del alimento líquido se mezclan en un mezclador estático y luego pasan al tubo de retención. Después se separan en separador donde se reduce la presión. Recientemente, se presentó en un congreso otra planta piloto de similar configuración para pasteurización en continuo de vino con capacidad de 2 l min<sup>-1</sup> instalada en el Instituto Fraunhofer, Stuttgart, Alemania (Varona y Vázquez, 2016).

Otra opción para lograr el contacto continuo donde el CO<sub>2</sub> es además finamente burbujeado sobre el alimento líquido es mediante el uso de una membrana (Sims y Estigarribia, 2002).

### 3.4. CONCLUSIONES

Las esporas de *B. cereus* en suspensión acuosa fueron inactivadas en COAP a medida que se aumentó la temperatura de operación. La completa inactivación ocurrió a 80°C que coincide con la temperatura del despertar térmico de las esporas. En cualquier caso, se demostró que el CO<sub>2</sub> tiene un efecto esporicida separado del calor, por lo que parece que una vez activadas las esporas de *B. cereus*, serían atacadas por el COAP causando su inactivación a más bajas temperaturas que con tratamiento térmico convencional que requeriría más de 100 °C según datos extrapolados de los obtenidos en este trabajo. La presión de aplicación podría mantenerse en bajos valores (100-150 bar) porque presiones superiores no fueron mucho más efectivas.

Si la operación se realiza en discontinuo, habría que aplicar tiempos elevados del orden de horas. Para reducir ese tiempo, lo más adecuado es llegar a un elevado nivel de carbonatación y de contacto, suministrando el COAP en microburbujas. La solución técnica está ya investigada. De hecho existen varias patentes que describen métodos de dispersión eficaz del CO<sub>2</sub> en medios líquidos; por ejemplo, a través de microburbujas formadas con un dispersor (Yutaka *et al.*, 1997) o con un contactor de membrana (Sims, 2001). En producciones en continuo, el tiempo de contacto debe ser superior a 15 min, que es un tiempo elevado.

Por comparación con datos previos de la inactivación de los organismos esporulados del pimentón (mayoritariamente esporas de *B. cereus*), se puede deducir que es mucho más difícil inactivar estas esporas en medios sólidos deshidratados que en agua, por la posible protección de los componentes del medio: grasas, nutrientes, etc., y por el importante impacto que tiene el agua en el efecto esporicida del COAP. Por un lado, el agua permite la germinación de las esporas que se hacen menos resistentes y por otro lado, contribuye a la reducción del pH del entorno, que es un factor sinérgico en el efecto letal del COAP, como se ha demostrado en este trabajo.

En el siguiente capítulo se muestran los resultados del uso de aditivos al CO<sub>2</sub> para mejorar la inactivación de organismos esporulados en alimentos deshidratados, concretamente para la inactivación de esporas de *B. cereus* en pimentón.

### **3.5. AGRADECIMIENTOS**

Esta investigación fue financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España a través de la ref proyecto. CTQ2010-18537 / PPQ.

### **3.6. REFERENCIAS**

Bae, Y.Y., Lee, H.J., Kim, S.A., Rhee, M.S., 2009. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice by supercritical carbon dioxide. Int. J. Food Microbiol. 136, 95–100.

- Ballestra, P., Cuq, J.-L., 1998. Influence of Pressurized Carbon Dioxide on the Thermal Inactivation of Bacterial and Fungal Spores. *LWT - Food Sci. Technol.* 31, 84–88.
- Black, E.P., Setlow, P., Hocking, A.D., Stewart, C.M., Kelly, A.L., Hoover, D.G., 2007. Response of Spores to High-Pressure Processing. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 6, 103–119.
- Calvo, L., Torres, E., 2010. Microbial inactivation of paprika using high-pressure CO<sub>2</sub>. *J. Supercrit. Fluids* 52, 134–141.
- Casas, J., Valverde, M.T., Marín-Iniesta, F., Calvo, L., 2012. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high pressure CO<sub>2</sub> in apple cream. *Int. J. Food Microbiol.* 156, 18–24.
- Dillow, A.K., Dehghani, F., Hrkach, J.S., Foster, N.R., Langer, R., 1999. Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 10344–10348.
- Enomoto, A., Nakamura, K., Hakoda, M., Amaya, N., 1997. Lethal effect of high-pressure carbon dioxide on a bacterial spore. *J. Ferment. Bioeng.* 83, 305–307.
- Fernández-Trujillo, J.P., Escarabajal, D., 2006. The traditional Spanish paprika processing in the Murcia Region and possible innovations. *Grasas y Aceites* 57.
- Furukawa, S., Watanabe, T., Tai, T., Hirata, J., Narisawa, N., Kawarai, T., Ogiwara, H., Yamasaki, M., 2004. Effect of high pressure gaseous carbon dioxide on the germination of bacterial spores. *Int. J. Food Microbiol.* 91, 209–213.



- Furukawa, S., Watanabe, T., Koyama, T., Hirata, J., Narisawa, N., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2009. Inactivation of food poisoning bacteria and *Geobacillus stearothermophilus* spores by high pressure carbon dioxide treatment. Food Control 20, 53–58.
- Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A.H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J.F., Devlieghere, F., 2007. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. Int. J. Food Microbiol. 117, 1–28.
- Haas, G.J., Prescott, H.E., Dudley, E., Dik, R., Hintlian, C., Keane, L., 1989. Inactivation of Microorganisms by Carbon Dioxide Under Pressure. J. Food Saf. 9, 253–265.
- Kincal, D., Hill, W.S., Balaban, M.O., Portier, K.M., Wei, C.I., Marshall, M.R., 2005. A Continuous High Pressure Carbon Dioxide System for Microbial Reduction in Orange Juice. J. Food Sci. 70, M249–M254.
- Leguerinel, I., Spegagne, I., Couvert, O., Gaillard, S., Mafart, P., 2005. Validation of an overall model describing the effect of three environmental factors on the apparent -value of spores. Int. J. Food Microbiol. 100, 223–229.
- McDonnell, G.E., 2007. Antisepsis, Disinfection and Sterilization, Types, Action and Resistance. ASM Press.
- McKee, L.H., 1995. Microbial contamination of spices and herbs: A review. LWT - Food Sci. Technol. 28, 1–11.

- Norton, T., Sun, D.-W., 2008. Recent Advances in the Use of High Pressure as an Effective Processing Technique in the Food Industry. *Food Bioprocess Technol.* 1, 2–34.
- Osajima, Y. Shimoda, M. Kawano, T., 1997. Method for inactivating enzymes, microorganisms and spores in a liquid foodstuff. US Patent 5,667,835.
- Quintavalla, S., Parolari, G., 1993. Effects of temperature, aw and pH on the growth of *Bacillus* cells and spores: a response surface methodology study. *Int. J. Food Microbiol.* 19, 207–216.
- Russel, A.D. Hugo, W.B. Aylife, G.A.J., 1999. Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. Blackwell Science.
- Shimoda, M., Kago, H., Kojima, N., Miyake, M., Osajima, Y., Hayakawa, I., 2002. Accelerated Death Kinetics of *Aspergillus niger* Spores under High-Pressure Carbonation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4162–4167.
- Sims, M. (Porocrit L.), 2001. Method and membrane system for sterilizing and preserving liquids using carbon dioxide. US6331272.
- Sims, M. Estigarribia, E., 2002. Continuous sterilization of aqueous pumpable food using high pressure carbon dioxide. 4th international symposium on high pressure process technology and chemical engineering.
- Spilimbergo, S., Elvassore, N., Bertucco, A., 2002. Microbial inactivation by high-pressure. *J. Supercrit. Fluids* 22, 55–63.

- Spilimbergo, S., Bertucco, A., Lauro, F.M., Bertoloni, G., 2003. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by supercritical CO<sub>2</sub> treatment. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 4, 161–165.
- Staack, N., Ahrné, L., Borch, E., Knorr, D., 2008. Effect of infrared heating on quality and microbial decontamination in paprika powder. *J. Food Eng.* 86, 17–24.
- Varona, S., Vázquez, A.L., 2016. Application of the Dense Phase Gas Pasteurization in winemaking-Influence of the product matrix, in: 15th European Meeting on Supercritical Fluids, 8-11 May, Essen, Germany.
- Watanabe, T., Furukawa, S., Hirata, J., Koyama, T., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2003a Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* Spores by High-Pressure Carbon Dioxide Treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7124–7129.
- Watanabe, T., Furukawa, S., Tai, T., Hirata, J., Narisawa, N., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2003b High Pressure Carbon Dioxide Decreases the Heat Tolerance of the Bacterial Spores. *Food Sci. Technol. Res.* 9, 342–344.
- Werner, B.G., Hotchkiss, J.H., 2006. Continuous Flow Nonthermal CO<sub>2</sub> Processing: The Lethal Effects of Subcritical and Supercritical CO<sub>2</sub> on Total Microbial Populations and Bacterial Spores in Raw Milk. *J. Dairy Sci.* 89, 872–881.

Yutaka, O. Mituya, S. Tamotu, K. Kunihiro, O. (Shimadzu corporation), 1997.

Method of and system for processing liquid foodstuff or liquid medicine with a supercritical fluid of carbon dioxide. JP9206044, EP0786513, US5704276.



**4. INACTIVACIÓN MICROBIANA DE PIMENTÓN**  
**CON ACEITES ESENCIALES Y SU**  
**COMBINACIÓN CON CO<sub>2</sub> A ALTA PRESIÓN**



## 4.1. INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales (AEs) son líquidos aceitosos aromáticos obtenidos a partir de material vegetal. Poseen propiedades antimicrobianas debido a su composición, principalmente por la presencia de componentes terpenoides y fenólicos, aunque también podría ser debido a la presencia de otros compuestos de menor importancia, pero que juegan posiblemente un efecto sinérgico (Burt, 2004, Seow *et al.*, 2014 y Tajkarimi *et al.*, 2010). En consecuencia, la actividad antibacteriana es más probable que consista en más de un mecanismo, debido a los diferentes grupos funcionales de los compuestos químicos presentes en los AEs.

Una discusión profunda de la acción antibacteriana de los AEs y sus componentes se da en Burt (2004). Debido a la hidrofobicidad de los aceites esenciales, se puede producir la partición de los lípidos presentes en la membrana celular de bacterias y mitocondrias, perturbando así la estructura y, finalmente, el aumento de su permeabilidad. Por lo tanto, los iones y otros contenidos celulares pueden gotear y generar una extensa fuga de moléculas o iones críticos que pueden conducir a la muerte de la célula. Además, los compuestos fenólicos de los AEs pueden provocar otras alteraciones como la interrupción de la fuerza motriz de protones, el flujo de electrones, el transporte activo y la coagulación del contenido de la célula. Componentes de los AEs también parecen inhibir proteínas de las células embebidas en la membrana citoplasmática. Como consecuencia, cada aceite esencial muestra una acción inhibitoria específica en un determinado microorganismo.



Generalmente es necesaria una mayor concentración de AE para lograr el mismo efecto antimicrobiano en alimentos que las pruebas in vitro (Smid y Gorris, 1999). Por ejemplo, la inhibición del crecimiento de las esporas de *Clostridium botulinum* en la carne por acción del AE de orégano se redujo drásticamente en comparación con el caldo (Ismaiel y Pierson, 1990). Una posible causa podría ser la mayor disponibilidad de nutrientes en los alimentos en comparación con los medios sintéticos, lo que permitiría a las bacterias reparar las células dañadas más rápido (Gill *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha demostrado que algunos compuestos de los alimentos tienen un efecto protector en el crecimiento bacteriano (Hansen y Riemann, 1963). En primer lugar, un alto nivel de grasa / proteínas (Aureli *et al.*, 1992) y, en segundo lugar un bajo contenido de agua (Smith-Palmer *et al.*, 2001). Por último, se ha sugerido que la estructura física de algunos alimentos limita la actividad antibacteriana de los AEs, presumiblemente debido a la limitación de su difusión (Skandamis y Nichas, 2000). El pimentón contiene altos niveles de oleorresina y es un polvo de baja actividad de agua. Por lo tanto, la acción de los AEs será probablemente difícil.

Un posible inconveniente en el uso de AEs como agentes antimicrobianos es el impacto que causa en las propiedades organolépticas naturales del alimento (Naveena *et al.*, 2006 y Ouattara *et al.*, 2001). Los alimentos que generalmente se asocian con hierbas, especias o condimentos (como el pimentón) serían los menos afectados (Burt, 2004). Sin embargo, siempre hay que hacer pruebas sensoriales cuando se utilizan AEs como conservantes naturales. Además, deben desarrollarse estrategias para reducir el impacto de los AEs. Por ejemplo, se pueden utilizar en combinación con tratamientos físicos (tecnologías sinérgicas, en inglés “hurdle

technologies”) para alcanzar el nivel deseado de actividad antimicrobiana con cantidades más reducidas de AEs. De esta manera, la calidad de los alimentos y las propiedades organolépticas son mejor conservados (Juneja *et al.*, 2012 y Seow *et al.*, 2014). La combinación de calor y pequeñas cantidades de antimicrobianos naturales retrasó la germinación y el crecimiento de las esporas de *Bacillus* y *Clostridium spp.* (Cui *et al.*, 2011 y Periago *et al.*, 2006) e incluso consiguió la inhibición de esporas de *Bacillus coagulans* (Ungareti *et al.*, 2012). La irradiación de la carne de vacuno cruda pre-tratada con cinamaldehído produjo la inhibición del crecimiento de esporas de *B. cereus* (Ayari *et al.*, 2012). La combinación de procesamiento de alta presión (HPP) con AEs permitió concentraciones más bajas de éstos durante la formulación de alimentos y también de la intensidad del tratamiento HPP (Gayán *et al.*, 2012).

La actividad antimicrobiana de los AEs en especias no se ha investigado hasta el momento, aunque los experimentos sobre el uso de aceites esenciales en carne, pescado, productos lácteos, verduras, arroz y fruta son prometedores, tal y como se reporta en Burt (2004) y en Tajkarimi *et al.* (2010). Por otro lado, el efecto de diferentes AEs en medios modelo también se ha investigado extensamente (Gutiérrez *et al.*, 2009, Moosavy *et al.*, 2008, Valero y Giner, 2006 y Velluti *et al.*, 2004) infiriendo resultados satisfactorios en general.

La aplicación de aceites esenciales en pimentón como tratamiento antimicrobiano tiene dos ventajas principales. En primer lugar, hay trabajos que reportan actividad esporicida de AEs a elevadas concentraciones (Cho *et al.*, 2007, Lawrence y Palombo, 2009 y Uzeh y Oguntosin, 2014). En segundo lugar, el pimentón se

utiliza en la cocina normalmente junto con otros ingredientes (especialmente especias y hierbas). En particular, el clavo (*Syzygium aromaticum*) y el orégano (*Origanum vulgare*) son ampliamente utilizados en la elaboración de alimentos, junto con el pimentón, por lo que se han elegido sus aceites esenciales para realizar esta investigación.

El aceite esencial de clavo (AEC) es históricamente reconocido como un agente antimicrobiano y conservante (Ayoola *et al.*, 2008). Se obtiene de los capullos de las flores de *Syzygium aromaticum*, de la familia *Myrtaceae*. El eugenol es el principal constituyente activo del AEC (85%), seguido del acetato de eugenol,  $\beta$ -cariofileno y  $\alpha$ -humuleno así como trazas de estragol,  $\delta$ -cadineno y calamenene (Ayoola *et al.*, 2008; Goñi *et al.*, 2009). El AEC es eficaz contra las bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* y *Listeria monocytogenes*, ...) y Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, ..) (Dobree *et al.*, 2011, Prabuseenivasan *et al.*, 2006 y Tajkarimi *et al.*, 2010). Asimismo, se ha encontrado actividad esporicida del AEC contra *Bacillus subtilis* (Lawrence y Palombo, 2009). El eugenol aislado del AEC demostró ser capaz de inhibir el crecimiento de esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Bevilacqua *et al.*, 2008).

El aceite esencial de orégano (AEO) es conocido por poseer la actividad antibacteriana más fuerte dentro de los aceites esenciales (Burt, 2004). Es un miembro del género *Origanum*, familia *Labiatae*. El contenido total de fenoles es de aproximadamente 90%, principalmente carvacrol (Sivropoulou *et al.*, 1996). Otros compuestos notables, presentes en concentraciones más bajas (<10%), son los

precursores de fenol p-cimeno y  $\gamma$ -terpineno, así como el timol. Si bien el p-cimeno y  $\gamma$ -terpineno no parecen ser bactericidas, el carvacrol y el timol exhiben altos niveles de actividad antimicrobiana (Burt, 2004). En concreto, hay varios artículos sobre el uso efectivo de carvacrol contra *Bacillus cereus* (Friedman *et al.*, 2004 y Valero y Giner, 2006). Además, hay muchos estudios que describen las propiedades bacteriostáticas y bactericidas del AEO contra los patógenos más importantes, tales como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimorum*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (Dobre *et al.*, 2011, Friedman *et al.*, 2004, Ozkalp *et al.*, 2010, Saeed y Tarik, 2009 y Silva *et al.*, 2013), y varias especies de *Bacillus*, incluyendo *B. cereus* (Ozcan *et al.*, 2006 y Valero y Salmerón, 2003). Pero lo que es más importante para este trabajo, es que el AEO puede inhibir el crecimiento de las esporas bacterianas, como se ha demostrado en las especies de *Clostridium* (Ismail y Pierson, 1990 y Juneja *et al.*, 2012.); asimismo, el carvacrol podría inhibir el crecimiento de *Bacillus cereus* (Ultee *et al.*, 1998).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la viabilidad de la inactivación de la microbiota pimentón mediante el uso de dos aceites esenciales diferentes (clavo y orégano). Se hizo una primera serie de experimentos para determinar el aceite más eficaz (o la combinación más eficaz de ambos) en una suspensión de esporas aisladas de la carga biológica natural de pimentón. Luego se comprobó el efecto de ambos aceites en pimentón. Un segundo conjunto de experimentos se llevó a cabo combinando el AE seleccionado con CO<sub>2</sub> a alta presión buscando una sinergia de ambos tratamientos. El reto era lograr una alta actividad antimicrobiana previniendo la degradación de la calidad del pimentón. Por lo tanto, también se evaluó el impacto de estos tratamientos sobre el color y el olor del pimentón.

## **4.2. MATERIALES Y METODOLOGÍA**

### **4.2.1. Materiales**

Pimentón en polvo, con un tamaño medio de partículas de menos de 0,5 mm y un contenido de humedad de  $9,4 \pm 0,5\%$ , fue proporcionado por el Centro Tecnológico Español de Conservación de Alimentos. El pimentón se almacenó a temperatura ambiente en un recipiente cerrado y opaco para evitar su deterioro durante la investigación.

El aceite esencial de orégano (FCC, Sigma-Aldrich, España) y el aceite esencial de clavo (FCC, Sigma-Aldrich, España) se almacenaron en la nevera.

El dióxido de carbono a su presión de vapor (aproximadamente 50 bar), 99,998% de pureza, fue proporcionado por Air Products, España. Los medios de cultivo fueron suministrados por Scharlau Chemie SA, distribuido por Scharlab, SL, España.

### **4.2.2. Análisis microbiano de pimentón**

Para la determinación de la contaminación microbiana de pimentón antes y después de los tratamientos, se añadieron cinco gramos de pimentón a 45 ml de agua estéril desionizada en condiciones estériles. Se prepararon diluciones en serie, y 0,1 ml se sembraron en placas de Petri que contenían agar de recuento en placa (PCA) y se cultivaron a 30 °C durante 48 h.

### **4.2.3. Generación y concentración de esporas las esporas naturales del pimentón**

La microbiota natural del pimentón se cultivó en placas de Petri que contenían 20 ml de agar nutritivo con  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  a  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  para promover su esporulación. Las placas se incubaron durante 48 h a  $37^\circ\text{C}$ . Las colonias desarrolladas se lavaron con 15 ml de solución salina ( $\text{NaCl}$  0,9%) y fueron barridas con un portaobjetos de microscopio estéril. Después de la recogida, las esporas se centrifugaron a  $10.000 \times g$  durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 50 ml de solución salina y se almacenó a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso posterior. Un mililitro de esta suspensión contenía aproximadamente  $4 \times 10^8$  esporas.

### **4.2.4. Pruebas de difusión en disco de agar para seleccionar el EO más eficaz**

La selección del mejor AE entre AE de clavo, orégano y una mezcla 50:50 (v / v) de ambos se realizó utilizando la prueba de difusión en agar descrita previamente por Mah *et al.* (2001), con algunas modificaciones. Brevemente, los discos que contenían una cierta concentración del AE seleccionado (10, 30, 50 y 100% v v<sup>-1</sup>) se colocaron en una placa con PCA inoculada con 0,1 ml de suspensión de las esporas previamente diluida 1:10 en agua de peptona y distribuida de manera uniforme. A continuación, las placas se incubaron durante 24 horas a  $30^\circ\text{C}$ . El halo de inhibición (cm) se midió desde el extremo del disco hasta la frontera extrema del halo. Las diluciones del AE se realizaron por medio de isopropanol. Como el isopropanol es bactericida, se esperó 24 h antes de la colocación de los discos sobre cada medio de agar para inducir la evaporación del isopropanol. También se

prepararon una placa de control positivo, otra de control negativo y una placa con discos de isopropanol puro.

#### **4.2.5. Ajuste de la humedad**

Se humedecieron 5 g de pimentón con 2,5 g de agua estéril y se agitaron suavemente en una bolsa Stomacher para su distribución uniforme. Las muestras obtenidas se secaron a la humedad deseada a temperatura ambiente dentro de la cámara de flujo laminar para evitar la germinación, y después se sometieron a tratamiento con CO<sub>2</sub> como se describe en la sección 4.2.9.

#### **4.2.6. Determinación de la contaminación**

El grado de desactivación se midió como el logaritmo del recuento de CFU por ml o g después del tratamiento (N) respecto al que había antes (N<sub>0</sub>). La desviación estándar de las lecturas fue de  $\pm 0,3$  log. Cada dato representado es el promedio de al menos tres mediciones.

#### **4.2.7. Método para la inactivación de la carga biológica de pimentón con EO orégano**

Cuarenta gramos de pimentón se mezclaron con la cantidad deseada de AEO para obtener concentraciones de 400, 1.600, 3.200, 16.000, 20.000 y 32.000 ppm respectivamente. Después, la mezcla se agitó vigorosamente durante diez minutos y se dejó en contacto a temperatura ambiente a tiempos crecientes hasta 48 h.

#### **4.2.8. Equipo de alta presión de dióxido de carbono**

El tratamiento con CO<sub>2</sub> a alta presión se realizó utilizando la instalación a escala de laboratorio mostrada en la Figura 4.1. Consistía en una línea de alimentación de CO<sub>2</sub> y de aceite esencial, un recipiente de 100 ml de 316 ss, un dispositivo de control de presión (regulador de contrapresión) y un caudalímetro másico colocado al final de la línea para medir la cantidad de CO<sub>2</sub>.

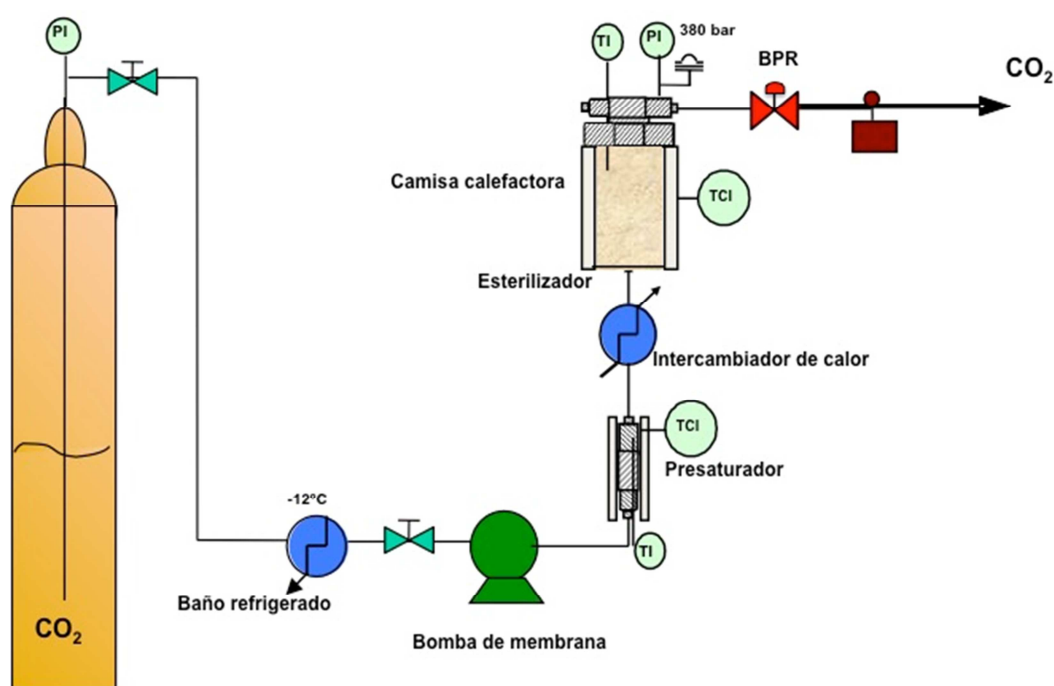
#### **4.2.9. Método para la inactivación de la carga biológica de pimentón usando COAP y OEO**

El recipiente se cargó con 20 ml de la suspensión de esporas aisladas del pimentón o con 5 g de pimentón y se transfirió al equipo de alta presión en condiciones estériles. El pimentón con la carga natural se cargó en el recipiente formando un lecho fijo. El CO<sub>2</sub> se presurizó y luego se precalentó en una camisa a 80°C. Un trozo de algodón empapado en el AE se colocó en el recipiente presaturador. La temperatura de este recipiente también se fijó en 80°C. A su paso por el presaturador el CO<sub>2</sub> arrastró el AEO. La mezcla se pasó a caudal constante sobre el lecho de pimentón durante 30 min. Después de esto, la bomba se detuvo, el sistema se despresurizó, y el pimentón se descargó en una cámara de flujo laminar para el análisis microbiano posterior.

Los tratamientos térmicos se realizaron para comparar el efecto por separado del calor. En estos experimentos, el procedimiento era en gran parte igual, excepto que no se introdujo CO<sub>2</sub> en el recipiente. En su lugar, el pimentón solo o la mezcla del



pimentón y AEO a la concentración deseada se mantuvieron dentro del recipiente con la camisa calefactora a la temperatura objetivo durante el mismo tiempo que las pruebas comparativas con CO<sub>2</sub>. Para los ensayos que examinaron el efecto de las variaciones de humedad en el pimentón, después de la adición del AEO, el agua se atomizó uniformemente para obtener el aumento de los niveles de humedad de hasta 35%, que fue determinado por el peso.



**Figura 4.1.** Instalación de tratamiento con COAP mezclado con AEO.

#### 4.2.10. El análisis sensorial

Se realizaron pruebas discriminatorias para examinar las diferencias en el olor y el color entre las muestras pimentón tratados y de control (como se recibió). Estas pruebas se llevaron a cabo por un grupo de seis personas que fueron reclutados entre estudiantes y el personal del Departamento de Ingeniería Química. Los miembros del panel fueron entrenados para graduar el olor y el color del pimentón

que se había enriquecido con aceite esencial de orégano en concentraciones de hasta 800 ppm.

Los exámenes consistían en una prueba triangular de tres muestras, dos de las cuales eran idénticas y la tercera diferente, según el enfoque de Sancho *et al.* (1999). Las muestras se codificaron al azar con tres dígitos y se presentaron a cada individuo en recipientes opacos en el vértice de un triángulo. Después, se pidió a los panelistas que olieran las muestras en el sentido de las agujas del reloj y que eligieran la muestra que, en su opinión, presentaba diferencias olfativas. También se les pidió que anotaran el discernimiento mediante una escala de cuatro niveles: 0, imperceptible; 1, leve; 2, perceptible pero agradable; 3, fuerte y desagradable. La evaluación del color se realizó de una manera similar. Sin embargo, durante este ensayo, las muestras fueron presentadas en una cubierta de placa de Petri, y se pidió a los panelistas que identificaran cualquier diferencia que percibieran a simple vista.

#### **4.2.11. Análisis estadístico**

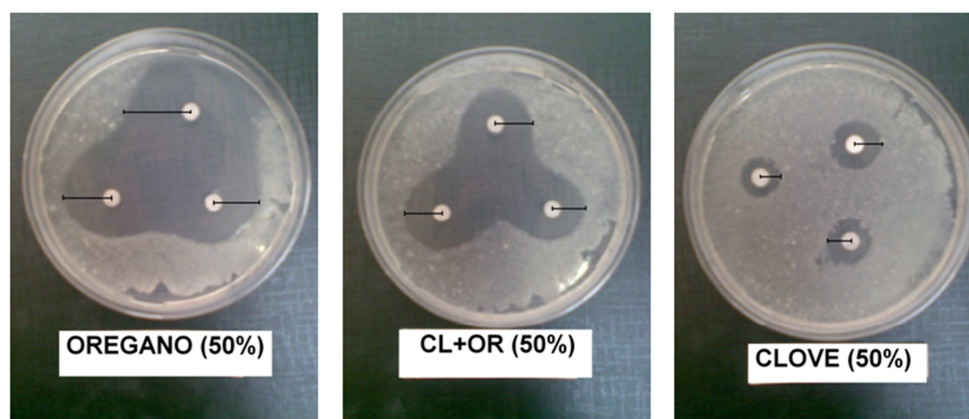
Los experimentos se repitieron al menos tres veces. Los análisis microbianos se realizaron por duplicado para cada réplica ( $n = 3 \times 2$ ). Se calcularon las medias y las desviaciones estándar para todos los datos. Las reducciones logarítmicas en el recuento microbiano después de las pruebas COAP más AEO se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) en el modelo lineal general con el software Statgraphics (Statistical Graphics Corp. Rockville, MD, EE.UU.). Un nivel de significación de  $\alpha = 0,05$  denota que los resultados, en términos de factores de operación; son significativos estadísticamente.

### **4.3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad de la inactivación de la carga biológica natural presente en el pimentón por medio de aceites esenciales (orégano y / o clavo) y su combinación con el dióxido de carbono a alta presión. En primer lugar, se evaluó el AE que poseía la actividad más fuerte contra las esporas aisladas de pimentón como las formas más resistentes presentes. En segundo lugar, tanto para mejorar la difusión del AE en la matriz del alimento como para ver si era posible un efecto sinérgico, se realizó un tratamiento combinado con COAP. Por último, se llevó a cabo un análisis sensorial para definir la máxima concentración aceptable del AE seleccionado en pimentón, según la percepción de los consumidores.

#### **4.3.1. Selección de la EO más eficaz**

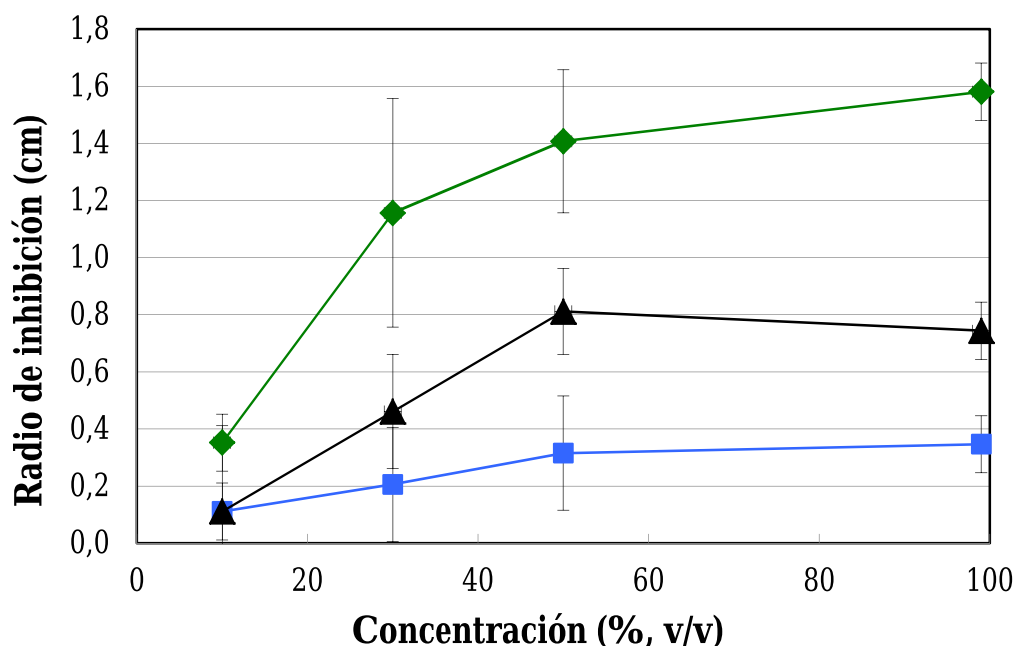
Se probaron los aceites esenciales de clavo y orégano para hacer una selección preliminar del que poseía la actividad inhibidora más fuerte contra las esporas aisladas del pimentón. Para ello, se realizaron pruebas de difusión en agar de cada AE solo y de una mezcla al 50% en masa de ambos. Las comparaciones se realizaron a concentraciones que iban desde 10% (v v<sup>-1</sup>) a AE puro por medio de diluciones en isopropanol, que resultó no ser esporicida. El radio promedio reportado no tiene en cuenta el radio del disco, 0,2 cm, y por lo tanto se refiere a un radio de corona circular. Un ejemplo de las imágenes obtenidas se muestra en la Figura 4.2 para la concentración de 50%.



**Figura 4.2.** Halo de inhibición del crecimiento de las esporas aisladas de pimentón, con aceite esencial de orégano, orégano + clavo 1: 1 y clavo, respectivamente, a una concentración de 50% ( $v v^{-1}$ ).

Ambos aceites demostraron inhibir el crecimiento de las esporas aisladas (ver Figura 4.3), con un radio que va desde 0,10 cm (clavo, 10%  $v v^{-1}$ ) a 1,62 cm (orégano, 100%  $v v^{-1}$ ). De forma similar, Chaibi *et al.*, 1997 encontraron actividad inhibidora de varios AEs contra las esporas de *B. cereus* y Lawrence y Palombo, 2009 en contra de las esporas de *B. subtilis*. Por otra parte, el AE de orégano mostró la actividad antimicrobiana más fuerte en todas las concentraciones. Del mismo modo, Cho *et al.* (2007) informó que el extracto de hojas de orégano poseía un efecto de inhibición más alto que el extracto de clavo contra las esporas de *B. subtilis*. No se encontró aparente efecto sinérgico entre ambos AEs. La falta de sinergia entre los aceites esenciales también fue observado por Goñi *et al.* (2009), sobre varios microorganismos en forma vegetativa, incluyendo *B. cereus*.

Como sugieren los resultados, la investigación se centró en la aplicación de aceite esencial de orégano (AEO) para inactivar la carga microbiana de pimentón.



**Figura 4.3.** Radio de inhibición del crecimiento de las esporas aisladas del pimentón según el tipo de aceite esencial empleado (♦: Orégano EO; ▲: Clavo EO + orégano EO (50% -50%, g g<sup>-1</sup>); ■: Clavo EO) a diferentes concentraciones (10, 30, 50 y 100%, v v<sup>-1</sup>)

#### 4.3.2. Método para la inactivación de la carga biológica de pimentón con AEO

La actividad antimicrobiana de AEO contra la carga biológica de pimentón se puso a prueba a concentraciones que variaron de 400 a 32000ppm (3,2%), mientras que el tiempo de contacto entre el pimentón y AEO varió desde 15 min hasta 48 h. Dentro de las condiciones ensayadas, se observó una reducción media de 0,3 logs de la biocontaminación original a partir de 1.600 ppm (véase la Tabla 4.1). La reducción del recuento total aerobio muestra una dependencia leve con el tiempo de contacto en las cuatro primeras horas. Después, no se observó mejoría al prolongar el tiempo hasta dos semanas. Así, el análisis microbiano realizado en las muestras

tratadas con AEO en 1.600 y 16.000 ppm después de este prolongado período mostró que el recuento total era constante (datos no mostrados).

Por tanto, solo una fracción de la microbiota del pimentón correspondiente a las células vegetativas (50%) fue inactivada por la adición de la AEO dado que la eliminación de esta fracción es la que supone los 0,3 logs de reducción obtenidos.

**Tabla 4.1.** Actividad antimicrobiana de AEO en contra de la carga biológica de pimentón a diferentes concentraciones y tiempos de contacto. Los resultados se expresan como reducciones logarítmicas del recuento de aerobios totales. La desviación estándar media fue de  $\pm 0,1$ .

		Tiempo de contacto (h)				
		0,3	2	4	24	48
Concentración (ppm)	400	0,1	0,1		0,0	
	1600	0,2	-0,2	-0,4	-0,3	-0,3
	3200	-0,4	-0,4	-0,2	-0,3	-0,5
	16000	-0,3	-0,4	-0,3	-0,3	-0,2
	20000	-0,1	-0,3	-0,4	-0,3	-0,4
	32000	-0,2	-0,3	-0,4	-0,4	-0,4

Estos resultados no fueron totalmente inesperados. Los estudios anteriores que examinaron el efecto de los AEs en esporas en otros alimentos mostraron que los AEs solo tienen un efecto inhibitor sobre las esporas. Valero y Giner (2006) reportaron que la adición de 15  $\mu$ l de carvacrol (componente activo del AEO) por cada 100 ml de caldo de zanahoria inhibió el crecimiento de esporas de *B. cereus*

durante más de 60 días a 16°C. Por su parte, el aceite esencial de limón (0,08-0,16%) reprimió completamente la germinación de esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugo de limón durante 11 días, pero no afectó la viabilidad de esporas (Maldonado *et al.*, 2013). La incorporación de la AEO en concentraciones de 0,1 a 0,5% inhibió completamente la germinación de esporas de *C. perfringens* y el crecimiento exponencial durante el enfriamiento de 12 h; pero se requirieron mayores cantidades (hasta 2%) para lograrlo durante mayor tiempo (hasta 21 horas) (Juneja y Friedman, 2007).

Dado que un tratamiento con aceites esenciales resultó ser insuficiente para lograr un nivel satisfactorio de inactivación de esporas de la población natural de pimentón, a continuación se investigó la combinación de AEO con dióxido de carbono a alta presión.

#### **4.3.3. La inactivación a través de tratamiento combinado COAP + OEO**

Un trabajo previo del grupo reveló que el COAP solo era capaz de inactivar hasta dos ciclos logarítmicos de la carga biológica total de pimentón a 80 °C y hasta cinco ciclos a 95°C después de un tiempo de 45 minutos de contacto (Calvo y Torres, 2010). Además, en el capítulo anterior ha quedado demostrado que la carga natural de pimentón correspondiente sobre todo a esporas de *Bacillus cereus*, es más difícil de inactivar en este alimento por su alto grado de deshidratación y por el efecto protector de la oleorresina del pimentón y de otras sustancias.

El trabajo que se muestra en esta sección es el realizado mediante un el tratamiento

combinado para lograr un efecto esporicida superior y para proteger mejor el pimentón contra el desarrollo de los microorganismos. Para ello, el AEO se mezcló con el COAP y, después, entró en contacto con la muestra de pimentón. Para estos ensayos, una cantidad conocida de AEO se cargó en el recipiente llamado pre-saturador de modo que el CO<sub>2</sub> pudo arrastrarlo durante su paso. Por ejemplo, a 80 °C y 300 bar, aproximadamente 1 mg de AEO fue arrastrado por cada g de CO<sub>2</sub>.

La temperatura se fijó en 80°C por varias razones. La bio-contaminación más resistente de pimentón corresponde principalmente a microorganismos aerobios formadores de esporas mesófilas. Su activación ocurre a temperaturas entre 70 y 80 °C para reducir su resistencia a otros tratamientos. En consecuencia, en nuestro trabajo anterior, se encontró que la dependencia de la temperatura de inactivación fue superior a 80°C cuando se utilizaba COAP puro. Por otro lado, también se demostró que la calidad del pimentón tratado con COAP a 80 °C era preservada (Calvo y Torres, 2010).

La presión se fijó en niveles relativamente bajos (100 bar), porque los estudios anteriores expuestos en los capítulos 2 y 3 revelaron que el aumento de la presión no contribuyó de manera significativa a cualquiera de los posibles mecanismos esporicidas CO<sub>2</sub> pero, a valores más altos causó la extracción de oleoresina (Calvo y Torres, 2010). Para evitar cualquier impacto negativo en la calidad del pimentón, el tiempo de tratamiento se limitó a 30 min. Este orden de magnitud sería el más apropiado para un posible proceso comercial.

Los ensayos se realizaron a crecientes niveles de humedad debido a la importancia



de esta variable sobre la inactivación de las esporas por COAP demostrada en el pimentón (Calvo y Torres, 2010) y en hierbas y especias sólidas (Haas *et al.*, 1989). Por lo tanto, se exploraron cantidades crecientes de de humedad hasta 35% en masa.

Se utilizaron dos concentraciones de AEO: 3400 ppm (0,34%) y 25.800 ppm (2,58%). Los resultados de las reducciones totales de recuento de aerobios se muestran en la Figura 4.4. Para propósitos de comparación, se muestran también los resultados obtenidos por el tratamiento térmico, la adición de AEO y el uso del tratamiento COAP por sí solos.

En todos los tratamientos, cuanto mayor es la humedad, y por lo tanto el contenido de agua del pimentón, mayor es el nivel de inactivación. Por ejemplo, en el tratamiento combinado de COAP + 2,58% de AEO, cuando el contenido de humedad fue del 15%, la reducción del recuento total de aerobios estaba cerca de 1 log; mientras que, al 35% de contenido de agua, era de 2,5 logs, lo que equivale a una reducción de > 99,5% de la población microbiana. La estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) contribución del contenido de humedad inicial del pimentón a la reducción microbiana fue, presumiblemente, debido a la activación y la germinación de las esporas, haciéndolas menos resistentes al tratamiento combinado COAP-AEO.

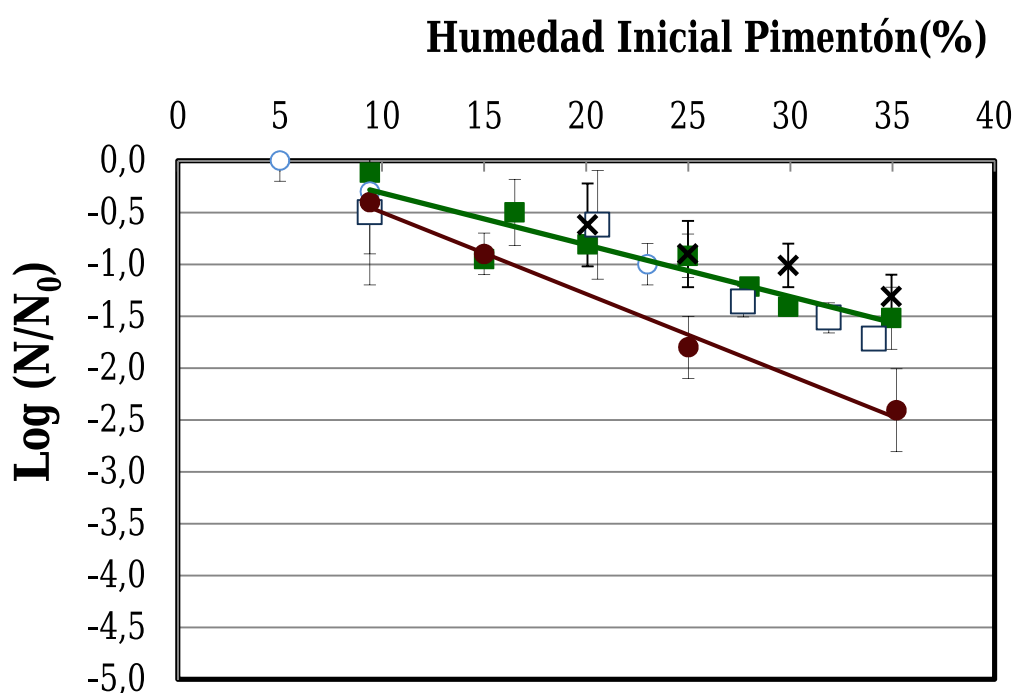
En la elaboración de pimentón, el secado se puede detener a estos niveles de agua para lograr este alto grado de reducción microbiana. Sin embargo, el contenido de agua máximo final en alimentos en polvo está regulada para evitar la proliferación

microbiana en condiciones de almacenamiento (En España, RD 2242/84). De esta forma, el contenido de agua no puede exceder de 11% para inhibir el crecimiento de la microbiota y consecuentemente la posible producción de toxinas. Sin embargo, en las pruebas anteriores utilizando COAP solo, se demostró que el pimentón se secó durante el tratamiento. La mayor parte del agua añadida se disolvió en el CO<sub>2</sub> o simplemente se evaporó en respuesta a la aplicación de calor. Por ejemplo, el pimentón con un 25% de humedad inicial terminó con un contenido de agua por debajo de los límites legales, después de un tratamiento COAP de 30 min a 80 °C (Calvo y Torres, 2010).

En cuanto al efecto del tratamiento combinado de COAP+AEO, se obtuvieron varias conclusiones. El uso exclusivo de AEO o COAP no dio lugar a más inactivación microbiana que la ocasionada por el tratamiento térmico en la muestra de pimentón. Tampoco la aplicación de bajas cantidades de AEO simultáneamente al tratamiento COAP. Por el contrario, el tratamiento COAP-AEO combinado a la mayor concentración causó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en la reducción de carga microbiana. El COAP y los aceites esenciales tienen diferentes impactos sobre el mecanismo de inactivación de esporas que podrían haber actuado de forma sinérgica. Por un lado, el COAP puede promover la germinación de las esporas en presencia de un poco de agua disminuyendo la resistencia de las formas germinadas (Furukawa *et al.*, 2004 y Watanabe *et al.*, 2003) a la acción del AEO. Por otra parte, observaciones SEM mostraron que la exposición a altas concentraciones de aceites esenciales provocó daños en la capa externa de las esporas de *B. subtilis* (Lawrence y Palombo, 2009). De acuerdo con el trabajo de García-González *et al.*

(2007), esta ruptura podría facilitar la penetración de CO<sub>2</sub> y alteraciones metabólicas posteriores.

Aunque los aceites esenciales de origen vegetal se clasifican como sustancias GRAS, la dosis más alta de AEO que resultó efectiva podría ser excesivamente alta desde el punto de vista organoléptico. Utilizando un análisis sensorial, se exploró la opción de usar COAP para eliminar el exceso de AEO remanente. Los resultados se describen en la siguiente sección.



**Figura 4.4.** Comparación de diferentes tratamientos sobre la inactivación microbiana de pimentón a diferentes niveles de humedad. La temperatura en todos los ensayos fue 80 °C (x: únicamente calor; ○: 25.800 ppm AEO; ■: COAP solo; □: COAP + 3400 ppm AEO; ●: COAP + 25.800 ppm AEO).

#### 4.3.4. Evaluación Sensorial

Debido a la presencia de carotenoides, el color de pimentón se caracteriza por una mezcla de amarillo y rojo. Su intensidad es el parámetro fundamental para determinar la categoría de pimentón. Se detectó una reducción leve del color en las muestras que fueron tratadas mediante COAP solo (Calvo y Torres, 2010).

Para estimar los efectos que la adición de AEO tenía en el color y el olor de pimentón, se llevó a cabo un análisis sensorial utilizando un panel de seis personas entrenadas. En cuanto al color, cinco miembros del panel reconocieron la muestra de pimentón con AEO a 400 ppm e informaron de un color ligeramente más oscuro. Otros autores también encontraron una disminución significativa en el valor de  $L^*$  en la carne de pollo suplementado con AEO (Kirkpinar *et al.*, 2014). Sin embargo, el AEO es un líquido transparente con un color ámbar claro. El efecto "mojado" podría haber causado esa percepción.

Por otra parte, cuatro de los panelistas pudieron apreciar un olor suave y deseable en las muestras de pimentón que habían sido tratadas con AEO a 200 ppm. Del mismo modo, el olor-sabor del caldo de zanahoria que contenía aceite esencial de canela hasta 200 ppm provocó reacciones favorables en los catadores (Valero y Salmerón, 2003). Sin embargo, todos los panelistas reconocieron las muestras de pimentón con niveles más altos de 400 ppm (0,04%) y reportaron un fuerte olor desagradable. Por el contrario, mayores cantidades de AEO de hasta 1% fueron aceptables en la carne y derivados de pescado (Karabagias *et al.*, 2011 y Mejlholm y Dalgaard, 2002).

La Tabla 4.2 muestra la percepción de olor de las muestras recogidas después del tratamiento combinado COAP + AEO (2,58%). El olor después del tratamiento de 30 minutos era todavía fuerte y desagradable. El color seguía siendo oscuro. Para reducir el impacto sensorial de cantidades tan altas, se probó a aumentar el tiempo de paso de COAP solo por el pimentón. Así, el CO<sub>2</sub> fue disolviendo el AEO remanente en el pimentón. Los panelistas percibieron un olor deseable y suave después de 10 min de pasar COAP solo, mientras que no reconocieron ningún cambio en el olor y color del pimentón después de 20 min.

**Tabla 4.2.** Resumen de la evaluación del olor de pimentón tratados con COAP y AEO a altas concentraciones (2,58% g·g<sup>-1</sup>).

Tiempo de tratamiento (min)	Media	Desviación estándar
30	3	0
Paso extra de COAP		
10	1,7	0,5
20	0	0

#### 4.4. CONCLUSIONES

En este trabajo se investigó un método para inactivar la bio-contaminación de productos deshidratados, ejemplarizado en pimentón, como una alternativa al enfoque tradicional de pasteurización con vapor de agua. Primero se estudió la aplicación de aceites esenciales y luego en combinación con CO<sub>2</sub> a alta presión.

El aceite esencial de orégano fue más efectivo que el aceite esencial de clavo pero aplicado incluso en elevadas cantidades, solo fue capaz de inactivar las formas vegetativas de la carga microbiana natural del pimentón.

Por el contrario, aplicado junto con el CO<sub>2</sub> a alta presión logró la inactivación de una elevada proporción de esporas. Por un lado, el CO<sub>2</sub> mejoró la dispersión del AEO en el polvo. Por otro lado, el CO<sub>2</sub> y el aceite esencial de orégano tuvieron diferentes impactos en el mecanismo de inactivación de las esporas, actuando aparentemente de forma sinérgica. Como consecuencia, un tiempo relativamente corto de tratamiento (30 minutos) fue suficiente para lograr una reducción del 99,5%, del recuento total de microorganismos, como es requerido por los clientes más exigentes. Debido a la importante contribución que el agua tiene en la germinación de las esporas, el pimentón tuvo que ser humedecido a un 35% de contenido en agua. Sin embargo, la humedad permitida para el almacenamiento se limita a 11% por la ley. Además, la dosis efectiva de AEO (2,6%) superó con creces el nivel de aceptación organoléptico que se estableció como 200 ppm (0,02%) por panelistas entrenados. Para cumplir con ambos requisitos, el procedimiento se modificó para incluir un segundo paso en el que se aplicó COAP solo a la muestra para eliminar el exceso de AEO y el exceso de agua.

La duración del paso extra de CO<sub>2</sub> podría ser sintonizada para asegurar que algo de AEO se mantuviese en la muestra. El pimentón se utiliza en pequeñas cantidades como condimento en muchos platos. Por lo tanto, el impacto final de pequeñas cantidades de AEO en el plato sería limitado. Por el contrario, si se dejase una pequeña cantidad de AEO, se podría mejorar la vida útil del plato al inhibir el crecimiento de los microorganismos supervivientes. Un buen ejemplo se puede encontrar en salchichas. La presencia de 45 ppm of AEO en salchichas de boloña tuvo un impacto positivo como agente antimicrobiano y resultó aceptable para los consumidores (Chi *et al.*, 2006). Más aún, la aplicación superficial de AEO en

salchichas curadas incrementó su dureza resultando en una mejor textura (Martín-Sanchez *et al.*, 2011).

#### **4.5.AGRADECIMIENTOS**

Esta investigación fue financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España a través de la ref proyecto. CTQ2010-18537 / PPQ.

Se agradece el apoyo en el análisis microbiológico a Florina Masca.

#### **4.6.REFERENCIAS**

- Aureli, P., Costantini, A., Zolea, S., 1992. Antimicrobial Activity of Some Plant Essential Oils Against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 55, 344–348.
- Ayari, S., Dussault, D., Jerbi, T., Hamdi, M., Lacroix, M., 2012. Radiosensitization of *Bacillus cereus* spores in minced meat treated with cinnamaldehyde. *Radiat. Phys. Chem.* 81, 1173–1176.
- Ayoola, G.A., Lawore, F.M., Adelowotan, T., Aibinu, I.E., Adenipekun, E., Coker, H.A.B., Odugbemi, T.O., 2008. Chemical analysis and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzigium aromaticum* (clove). *African J. Microbiol. Res.*
- Bevilacqua, a, Sinigaglia, M., Corbo, M.R., 2008. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: new methods for inhibiting spore germination. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 103–10.

- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253.
- Calvo, L., Muguerza, B., Cienfuegos-Jovellanos, E., 2007. Microbial inactivation and butter extraction in a cocoa derivative using high pressure CO<sub>2</sub>. *J. Supercrit. Fluids* 42, 80–87.
- Calvo, L., Torres, E., 2010. Microbial inactivation of paprika using high-pressure CO<sub>2</sub>. *J. Supercrit. Fluids* 52, 134–141.
- Chaibi, A., Ababouch, L., Belasri, K., Boucetta, S., Busta, F., 1997. Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* and *Clostridium botulinum* 62A spores by essential oils. *Food Microbiol.* 14, 161–174.
- Chi, S., 2006. Application of Chitosan Films Enriched with Oregano Essential Oil on Bologna - Active Compounds and Sensory Attributes. *Food Sci. Technol. Int.* 12, 111–117.
- Cho, W.-I., Choi, J.-B., Lee, K.-P., Cho, S.-C., Park, E.-J.C.M.-S., Pyun, Y.-R., n.d. Antimicrobial Activity of Medicinal Plants Against *Bacillus subtilis* Spore. *Food Sci. Biotechnol.* 16, 1072–1077.
- Chouliara, E., Karatapanis, A., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G., 2007. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4°C. *Food Microbiol.* 24, 607–617.
- Cui, H., Gabriel, A.A., Nakano, H., 2011. Heat-sensitizing effects of plant extracts on *Clostridium* spp. spores. *Food Control* 22, 99–104.



- Dehghani, F., Annabi, N., Titus, M., Valtchev, P., Tumilar, A., 2009. Sterilization of ginseng using a high pressure CO<sub>2</sub> at moderate temperatures. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 569–576.
- Dehghani, F., Annabi, N., Titus, M., Valtchev, P., Tumilar, A., 2009. Sterilization of ginseng using a high pressure CO<sub>2</sub> at moderate temperatures. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 569–576.
- Dobre, A.A., Gagi, V., & Petru, N., 2011. Antimicrobial activity of essential oils against foodborne bacteria evaluated by two preliminary methods. *Rom. Biotechnol. Lett.* 16, 119–125.
- Ekiomado, U.R., Olamide, O.D., 2014. Sporicidal Effect Of Some African Spices. *Adv Food Sci* 36, 30–32.
- Fernández-Trujillo, J.P., Escarabajal, D., 2006. The traditional Spanish paprika processing in the Murcia Region and possible innovations. *Grasas y Aceites* 57.
- Friedman, M., Henika, P.R., Levin, C.E., Mandrell, R.E., 2004. Antibacterial Activities of Plant Essential Oils and Their Components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in Apple Juice. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6042–6048.
- Furukawa, S., Watanabe, T., Tai, T., Hirata, J., Narisawa, N., Kawarai, T., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2004. Effect of high pressure gaseous carbon dioxide on the germination of bacterial spores 91, 209–213.

- Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A.H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J.F., Devlieghere, F., 2007. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 1–28.
- Gill, A., Delaquis, P., Russo, P., Holley, R., 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *Int. J. Food Microbiol.* 73, 83–92.
- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., Nerín, C., 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chem.* 116, 982–989.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiol.* 26, 142–150.
- Haas, G.J., Prescott, H.E., Dudley, E., Dik, R., Hintlian, C., Keane, L., 1989. Inactivation Of Microorganisms By Carbon Dioxide Under Pressure. *J. Food Saf.* 9, 253–265.
- Haberbeck, L.U., Alberto da Silva Riehl, C., de Cássia Martins Salomão, B., Falcão de Aragão, G.M., 2012. *Bacillus coagulans* spore inactivation through the application of oregano essential oil and heat. *LWT - Food Sci. Technol.* 46, 267–273.
- Haberbeck, L.U., Alberto da Silva Riehl, C., de Cássia Martins Salomão, B., Falcão de Aragão, G.M., 2012. *Bacillus coagulans* spore inactivation through the application of oregano essential oil and heat. *Leb. + [i.e. und] Technol.*

- Hansen, N.-H., Riemann, H., 1963. Factors Affecting the Heat Resistance of Nonsporing Organisms. *J. Appl. Bacteriol.* 26, 314–333.
- Ismail, A.A., Pierson, M.D., 1990. Effect of Sodium Nitrite and Origanum Oil on Growth and Toxin Production of *Clostridium botulinum* in TYG Broth and Ground Pork. *J. Food Prot.* 53, 958–960.
- Juneja, V.K., Dwivedi, H.P., Yan, X., 2012. Novel Natural Food Antimicrobials. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 3, 381–403. doi:10.1146/annurev-food-022811-101241
- Juneja, V.K., Friedman, M., 2007. Carvacrol, Cinnamaldehyde, Oregano Oil, and Thymol Inhibit *Clostridium perfringens* Spore Germination and Outgrowth in Ground Turkey during Chilling †. *J. Food Prot.* 70, 218–222.
- Karabagias, I., Badeka, A., Kontominas, M.G., 2011. Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. *Meat Sci.* 88, 109–116.
- Kirkpinar, F., Ünlü, H.B., Serdaroglu, M., Turp, G.Y., 2014. Effects of dietary oregano and garlic essential oils on carcass characteristics, meat composition, colour, pH and sensory quality of broiler meat. *Br. Poult. Sci.* 55, 157–166.
- Lawrence, H.A., 2009. Activity of Essential Oils Against *Bacillus subtilis* Spores. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 1590–1595.
- Mah, J.-H., Kim, K.-S., Park, J.-H., Byun, M.-W., Kim, Y.-B., Hwang, H.-J., n.d. Bacteriocin with a broad antimicrobial spectrum, produced by *Bacillus* sp. isolated from Kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 577–584.

- Maldonado, M.C., Aban, M.P., Navarro, A.R., 2013. Chemicals and lemon essential oil effect on *Alicyclobacillus acidoterrestris* viability. *Brazilian J. Microbiol.* 44, 1133–1137.
- Martín-Sánchez, A.M., Chaves-López, C., Sendra, E., Sayas, E., Fenández-López, J., Pérez-Álvarez, J.Á., 2011. Lipolysis, proteolysis and sensory characteristics of a Spanish fermented dry-cured meat product (salchichón) with oregano essential oil used as surface mold inhibitor. *Meat Sci.* 89, 35–44.
- McKee, L.H., 1995. Microbial contamination of spices and herbs: A review. *LWT - Food Sci. Technol.* 28, 1–11.
- Mejlholm, O., Dalgaard, P., 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 27–31.
- Moosavy, M.-H., Basti, A.A., Misaghi, A., Salehi, T.Z., Abbasifar, R., Mousavi, H.A.E., Alipour, M., Razavi, N.E., Gandomi, H., Noori, N., 2008. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes. *Food Res. Int.* 41, 1050–1057.
- Naveena, B.M., Muthukumar, M., Sen, A.R., Babji, Y., Murthy, T.R.K., 2006. Improvement of shelf-life of buffalo meat using lactic acid, clove oil and vitamin C during retail display. *Meat Sci.* 74, 409–415.

- Ouattara, B., Sabato, S.F., Lacroix, M., 2001. Combined effect of antimicrobial coating and gamma irradiation on shelf life extension of pre-cooked shrimp (*Penaeus* spp.). *Int. J. Food Microbiol.* 68, 1–9.
- Ozcan, M.M., Sagdic, O., Ozkan, G., 2006. Inhibitory effects of spice essential oils on the growth of *Bacillus* species. *J. Med. Food.*
- Ozkalp, B., Sevgi, F., Ozcan, M., & Ozcan, M.M., 2010. The antibacterial activity of essential oil of oregano (*Origanum vulgare*, L.). *J. Food Agric. Env.* 8, 272–274.
- Periago, P. M., Conesa, R., Delgado, B., Fernández, P. S., & Palop, A., 2006. *Bacillus megaterium* spore germination and growth inhibition by a treatment combining heat with natural antimicrobials. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 17–23.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S., 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement. Altern. Med.* 6, 39.
- Saeed, S., Tariq, P., 2009. Antibacterial activity of oregano (*Origanum vulgare* Linn) against gram positive bacteria. *Pak. J. Bot.* 22, 421–424.
- Sancho, J., Bota, E., & de Castro, J.J., 1999. *Introducción al análisis sensorial de los alimentos.* Edicions Universitat Barcelona.
- Seow, Y.X., Yeo, C.R., Chung, H.L., Yuk, H.-G., 2014. Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54, 625–644.

- Silva, N., Alves, S., Goncalves, A., Amaral, J.S., Poeta, P., 2013. Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. *Food Sci. Technol. Int.* 19, 503–510.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M., 1996. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Origanum* Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 44, 1202–1205.
- Skandamis, P.N., Nychas, G.-J.E., 2000. Development and Evaluation of a Model Predicting the Survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in Homemade Eggplant Salad at Various Temperatures, pHs, and Oregano Essential Oil Concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1646–1653.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol.* 18, 463–470.
- Staack, N., Ahrné, L., Borch, E., Knorr, D., 2008. Effect of infrared heating on quality and microbial decontamination in paprika powder. *J. Food Eng.* 86, 17–24.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O., 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21, 1199–1218.
- Ultee, Gorris, Smid, 1998. Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.* 85, 211–218.

- Valero, M., Giner, M.J., 2006. Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 90–94.
- Valero, M., Salmerón, M.C., 2003. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *Int. J. Food Microbiol.* 85, 73–81.
- Valverde, M.T., Marín-Iniesta, F., Calvo, L., 2010. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in conference pear with high pressure carbon dioxide and effects on pear quality. *J. Food Eng.* 98, 421–428.
- Velluti, A., Marin, S., Gonzalez, P., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2004. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. *Food Microbiol.*
- Watanabe, T., Furukawa, S., Tai, T., Hirata, J., Narisawa, N., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2003. High Pressure Carbon Dioxide Decreases the Heat Tolerance of the Bacterial Spores. *Food Sci. Technol. Res.* 9, 342–344.
- White, A., Burns, D., Christensen, T.W., 2006. Effective terminal sterilization using supercritical carbon dioxide. *J. Biotechnol.* 123, 504–15.
- Zhang, J., Burrows, S., Gleason, C., Matthews, M. a, Drews, M.J., Laberge, M., An, Y.H., 2006. Sterilizing *Bacillus pumilus* spores using supercritical carbon dioxide. *J. Microbiol. Methods* 66, 479–85.







**5. DESTRUCCIÓN DE ARMAS BIOLÓGICAS EN**  
**MATERIAL SENSIBLE MEDIANTE CO<sub>2</sub> A ALTA**  
**PRESIÓN**



## 5.1. INTRODUCCIÓN

Un **arma biológica**, también conocida como **bioarma** o **arma bacteriológica**, es cualquier patógeno (bacteria, virus, hongo u otro organismo) que cause enfermedades y que por tanto, se pueda utilizar como arma de guerra. Puede estar destinada a matar, discapacitar o impedir seriamente a un individuo, como a ciudades o lugares enteros.

Existen diferentes tipos de agentes biológicos, pero de entre todos ellos los que tienen mayor probabilidad de ser usados como arma biológica son las bacterias causantes del Ántrax o carbunco (*Bacillus anthracis*), tularemia (*francisella tularensis*), botulismo (*Clostridium botulinum*), cólera (*vibrio cholera*), brucelosis (*brucella spp*), peste (*yersinia pestis*) y shigelosis (*shigella spp*). También hay varios virus susceptibles de ser usados como armas biológicas. Concretamente el virus *smallpox* que causa viruela, o los causantes de encefalitis equinas (virus de la EEV y WEEV) y de hemorragias virales tipo Ébola (*Filovirus*), fiebre de lass, Junin, (*Arenavirus*) y amarilla o Dengüe (*Flavivirus*). Finalmente están las toxinas producidas por la actividad metabólica de algunos seres vivos (animales, plantas o bacterias) cuya utilidad como arma viene limitada por su baja toxicidad, requiriendo su uso en grandes cantidades para ser eficaz como arma biológica. Entre éstas, las más peligrosas son la ricina, la enterotoxina B, la saxitoxina, la micotoxina y la aflatoxina. En la Tabla 5.1 se muestra la dosis mínima infectante de los principales agentes biológicos (Monografías SOPT, 2010).

El Ántrax es considerado uno de los más efectivos por varias razones. En primer lugar, forma esporas fuertes, perfectas para su dispersión en aerosoles. En segundo lugar, porque aunque empieza con los síntomas de un resfriado ordinario, rápidamente se

vuelve letal, con una tasa de mortalidad del 90% o mayor. Además, mientras que otros agentes biológicos se descomponen rápidamente cuando están expuestos a la luz solar y otros factores del medio ambiente, las esporas de *Ántrax*, perduran en el material en el que se han dispersado durante largos periodos de tiempo, incluso decenas de años (Monografías SOPT, 2010).

**Tabla 5.1.** Agentes biológicos que más posibilidades tienen de ser utilizados como armas y la dosis mínima en que habría que dispersarlos en aerosoles (Monografías SOPT, 2010).

AGENTE	DOSIS (aerosol)
<i>Bacillus anthracis</i>	8.000 a 50.000 esporas
<i>Brucella spp.</i>	10 a 100 organismos
<i>Yersinia pestis</i>	100 a 500 organismos
<i>Francisella tularensis</i>	10 a 50 organismos
Virus de la viruela	10 a 100 organismos
<i>Clostridium botulinum</i>	0,001µg de toxina Tipo A
<i>Vibrio Cholerae</i>	10 a 500 organismos

La emisión de estas armas biológicas se puede hacer por varias maneras:

- En aerosoles dispersados en el aire, formando un fino rocío que puede extenderse por millas, normalmente lanzados desde aviones o mediante bombas o misiles. Este es el método militar estándar.
- En animales. Algunas de estas enfermedades se propagan por medio de insectos y animales, tales como pulgas, ratas, moscas y mosquitos. Deliberadamente

propagar enfermedades a través del ganado también se denomina agroterrorismo.

- Por contaminación de los alimentos y el agua. Algunos organismos y toxinas patogénicas pueden persistir en los suministros de agua y alimentos, o ser arrojados deliberadamente a los mismos. Aunque la mayoría de los microbios pueden matarse y las toxinas pueden desactivarse cocinando los alimentos e hirviendo el agua.

Las vías de entrada de estos agentes en el organismo humano pueden ser tres:

- Vía respiratoria (inhalación): A través de las fosas nasales, cuando el agente es transportado en forma de vapor o aerosol.
- Vía digestiva (ingestión): Por la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas con el agente biológico.
- Vía cutánea (percutánea): A través de heridas, pequeñas grietas o lesiones de la piel y de las mucosas, aún siendo ellas, en sí mismas, barreras efectivas contra la entrada de agentes biológicos en el organismo.

Aunque el uso de armas biológicas es relativamente reciente, la historia está llena de ejemplos de la utilización de agresivos de esta naturaleza con fines militares. Por ejemplo, tanto los colonizadores españoles como ingleses protagonizaron ataques masivos de viruela a poblaciones indígenas en América. Sin embargo, la guerra

biológica no alcanzó su sofisticación hasta el siglo XX, y en concreto hasta la Primera Guerra Mundial, cuando el ejército alemán desarrolló ántrax, peste bubónica y cólera para su uso específico como armas biológicas, extendiendo una plaga en San Petersburgo, Rusia. Años más tarde, durante la segunda guerra mundial, las fuerzas japonesas crearon un cuerpo de investigación de guerra biológica secreto, que realizó múltiples experimentos en presos. También los aliados emplearon armas bacteriológicas en varias ocasiones. En 1952 radio Corea anunció que el ejército americano había empleado armas bacteriológicas, aunque hasta ahora no se conoce si fue verdad. En 1979 se liberaron accidentalmente en la Unión Soviética, esporas de Ántrax, provocando la muerte de al menos 68 personas. Este mismo microorganismo se envió por correo a personas del gobierno y a medios de comunicación en los Estados Unidos, a finales de 2001, generando un gran pánico social con el resultado de algunas muertes. España también se vio afectada por la crisis de ántrax del 2001, recibiendo hasta 800 sobres sospechosos de contener este microorganismo y otras sustancias biológicas. Quizá sea este momento el que haya marcado un interés por estas armas y por su control.

En estos momentos, se conoce que al menos EE.UU. posee bio-armas, pero es probable que también dispongan de ellas Rusia, Israel, China e Irán. Y están vigiladas por los servicios de inteligencia estadounidenses: Italia, Bulgaria, India, Pakistán, Rumania, Corea del Norte, Rusia, Cuba, Irak, Sudáfrica, Egipto, Libia, Taiwán, México y Chile. Pero no está generalizada la aplicación de tecnologías que eliminen la contaminación una vez dispersada en suelos, ropas u otros objetos que no sea la destrucción mediante incineración (Fraise et al, 2013).

En esta investigación se propone el uso de CO<sub>2</sub> alta presión, COAP. En la Tabla 1.4. en la Introducción se mostraba la eficacia de inactivación del COAP en esporas de *bacillus* similares al Ántrax. La Tabla 5.2. muestra algunos trabajos realizados con COAP en la inactivación de virus que podrían ser usados como potenciales armas biológicas.

**Tabla 5.2.** Resumen de la investigación realizada en la eliminación de virus mediante COAP.

Virus	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Aditivo	log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Referencia
<i>HIV-1</i>	250	50	10		-4,0	Fages <i>et al.</i> , 1998
<i>Sindbis</i>	250	50	10		-4,3	
<i>Polio Sabin Tipo I</i>	250	50	10		-6,6	
<i>Pseudorabies</i>	250	50	10		-4,0	
<i>Coronavirus</i>	160	40	30		> -6,0	Chen <i>et al.</i> , 2006
<i>Herpesvirus</i>	160	40	30		> -7,0	
<i>Flavivirus</i>	160	40	30		> -8,0	
<i>Arterivirus</i>	160	50	30		> -9,0	
<i>Porcine Encephalomyocarditis</i>	100	41	120		-3,7	Qiu <i>et al.</i> , 2009
<i>Porcine parvovirus</i>	100	41	120	Acido peracético	-5,5	
<i>Porcine pseudorabies</i>	100	41	120	(55 ppm)	-7,1	
<i>Murine leukemia</i>	100	41	120		-5,1	

Lo que se pretendió en este trabajo fue demostrar la viabilidad de la destrucción de armas biológicas en trajes y utensilios militares mediante CO<sub>2</sub> supercrítico. Para ello se abordaron tres objetivos específicos:

1. Hacer el estudio de la eficacia letal del CO<sub>2</sub> a alta presión sobre *B. thuringiensis* sobre el que no había bibliografía previa, como modelo de bacteria esporulada que se podría usar como arma biológica tipo Ántrax, dado que poseen el mismo genoma (Helgason *et al.*, 2000).



2. Asegurarse que el CO<sub>2</sub> a alta presión era eficaz en la desactivación de las esporas, una vez que estas contaminaban la ropa u otros materiales militares. Concretamente se realizaron en muestras de tejidos y componentes electrónicos que componen el traje militar de protección NBQ (de las siglas nuclear, biológico y químico), contaminados con esporas de *B. thuringiensis*.
3. Analizar el aspecto y capacidad funcional del material tratado para demostrar la viabilidad del proceso.

## **5.2. MATERIALES Y METODOLOGÍA**

### **5.2.1. Microorganismo**

La cepa utilizada fue *Bacillus thuringiensis* (CECT 197T; ATCC 10792; CIP 53.137; DSM 2046) procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo.

### **5.2.2. Medio de cultivo**

Se utilizó el medio de cultivo específico recomendado por el proveedor: “nutrient broth/agar I” que contenía: 5 g de extracto de carne, 10 g de peptona, 5 g de NaCl, 15 g de agar (sólo para medio sólido) y 1 L de agua destilada, ajustándose el pH a 7,2. Para la generación de esporas, se adicionó 0,1g de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O. Todos los reactivos fueron suministrados por Sigma Aldrich.

### 5.2.3. Aditivos

El ácido cítrico (99,5%), ácido peroxiacético (15%), peróxido de hidrógeno (6%) y el alcohol isopropílico (99,9%) fueron suministrados por Scharlau Chimie.

### 5.2.4. Generación y concentración de esporas de *B. thuringiensis*

Se recuperó el microorganismo a partir de un eppendorf, en un matraz con unos 100 mL de caldo específico, y se cultivó en un baño con agitación (150 rpm) durante 8 horas a 45 °C. Posteriormente se adicionó 0.1 mL de este cultivo mediante siembra en superficie sobre placas Petri con el medio específico que además contenía 0.1 g·L<sup>-1</sup> de Mn (MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, Panreac). De esta forma se prepararon en total 20 placas. Antes de ponerlas boca abajo se dejó que todo el líquido se adsorbiera. A continuación se incubaron en la estufa 2 días a 45 °C.

Pasado este tiempo se hizo un lavado de las mismas adicionando dos tandas de 7,5 mL de H<sub>2</sub>O destilada sobre cada una en la superficie. En cada lavado, se realizó un arrastre con un portaobjetos estéril por toda la superficie de la placa para recoger las esporas formadas.

El agua se recogió en cuatro tubos de centrifuga de 75 mL. A continuación se centrifugó a 10.000 r.p.m durante 10 min, se retiró el sobrenadante, se resuspendió en 12 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril y se juntaron los contenidos de los cuatro tubos en uno (48 mL). Después se sometió a tratamiento térmico (90°C durante 15 min) para inactivar las formas vegetativas que pudieran quedar en la suspensión, obteniendo una

concentración de  $10^8$  ufc·mL<sup>-1</sup> de esporas viables. Se diluyó hasta  $10^6$  ufc·mL<sup>-1</sup> para los ensayos realizados en fase líquida y para conseguir  $10^7$  ufc·g<sup>-1</sup> en los ensayos hechos sobre tejidos y material electrónico.

#### **5.2.5. Contaminación de los materiales de equipamiento NBQ**

Para lograr la contaminación de los tejidos se introdujeron 5 g de cada tejido en la suspensión de esporas de concentración  $10^8$  ufc·mL<sup>-1</sup> durante 10 minutos y se dejó secar en cámara de flujo laminar.

En cuanto a los materiales electrónicos, la contaminación se realizó tratando de simular, en la medida de lo posible, un ataque terrorista, es decir, dispersando las esporas en suspensión de forma atomizada. Concretamente se hizo de la siguiente forma: en cámara de flujo laminar, se atomizó una suspensión de  $10^7$  ufc·mL<sup>-1</sup> de esporas de *B. thuringiensis* sobre el material electrónico cubriendo toda la superficie de éste.

#### **5.2.6. Determinación de la contaminación de *B. thuringiensis* en los tejidos del traje NBQ y el material electrónico antes y después del tratamiento con CO<sub>2</sub>SC**

El tejido se introdujo en una bolsa stomacker con 10 mL medio y se dejó inmerso en él por media hora. Cogiendo 1 mL de ese medio, se preparó una tabla de diluciones seriadas para obtener la concentración de esporas por recuento de unidades formadoras de colonia (ufc) en las placas de Petri con el medio específico y la sal de Mn.

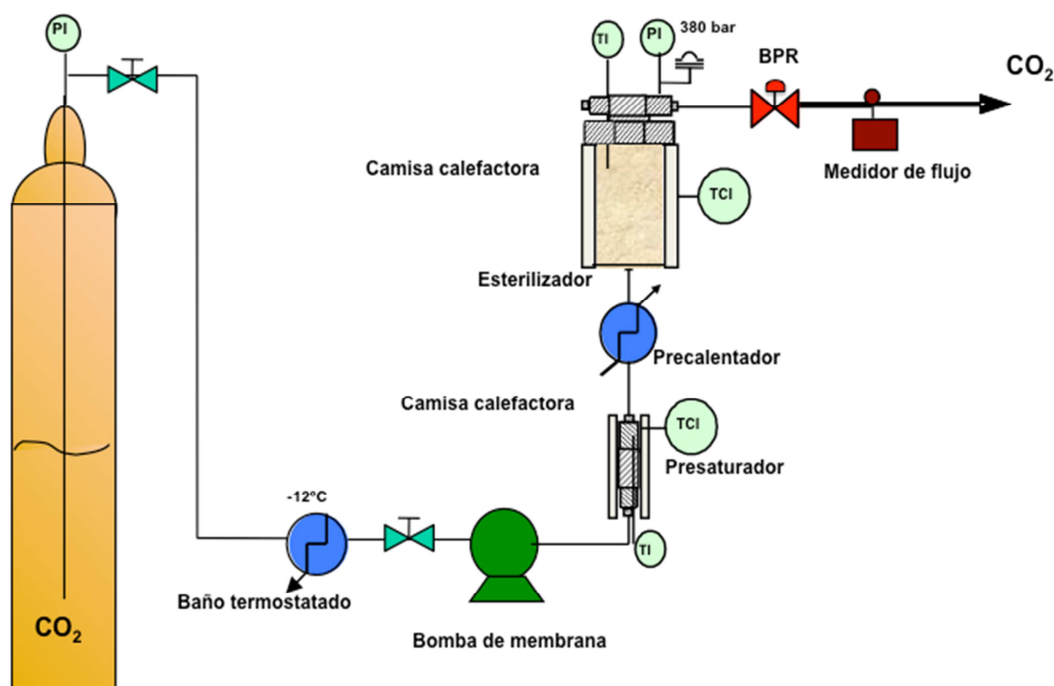
La contaminación en el material electrónico, se determinó pasando una torunda estéril por la superficie del mismo. A continuación la torunda se introdujo en 10 mL de medio específico y se preparó la tabla de diluciones seriadas de la misma forma.

Los resultados se expresaron en ambos casos como el logaritmo ( $\log_{10}$ ) del recuento después del tratamiento ( $N$ ) dividido por el recuento inicial ( $N_0$ ). La desviación estándar en las lecturas fue de  $\pm 0,3 \log$ .

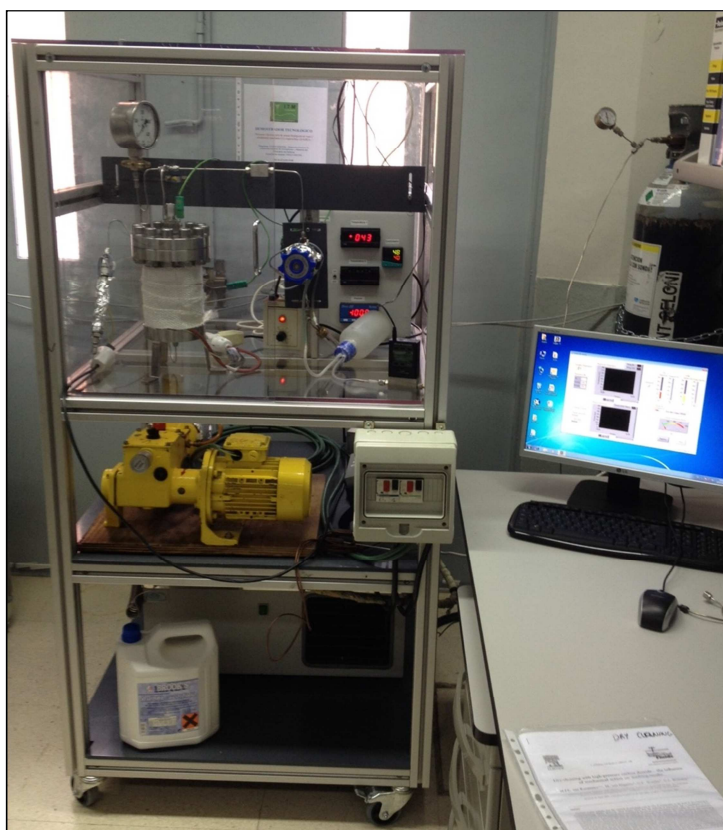
### **5.2.7. Equipo de tratamiento con CO<sub>2</sub>SC**

El esquema de la instalación utilizada se muestra en la Figura 5.1 y la imagen real de la misma en la Figura 5.2. El CO<sub>2</sub> suministrado en estado líquido, pasó por un baño térmicamente controlado (Selecta, Frigiterm-30, España) para enfriarlo a -10°C antes de llegar a la bomba de membrana (Milroyal MD23G6M250, Dosapro Milton Roy, Francia). La refrigeración de CO<sub>2</sub> evitó la cavitación durante la presurización. El CO<sub>2</sub> presurizado se precalentó en un tubo enrollado dentro de una camisa calefactora antes de entrar recipiente de alta presión (de 50 o 250 mL) donde estaba introducido el material a esterilizar. La temperatura era leída por un termopar tipo-K situado dentro del recipiente con una precisión de  $\pm 1^\circ\text{C}$ , mientras que la presión era leída en la salida del recipiente con un manómetro tipo Bourbon con una precisión de  $\pm 2 \text{ bar}$ .

En los ensayos donde se solubilizó agua en CO<sub>2</sub>, había un presaturador situado antes del recipiente de alta presión diseñado para dar un elevado tiempo de contacto. También contaba con un control de temperatura para conseguir que la solubilización del agua en CO<sub>2</sub> se hiciera a las mismas condiciones de temperatura que la posterior esterilización.



**Figura 5.1.** Esquema del equipo de tratamiento con COAP modificado con un presaturador de agua.



**Figura 5.2.** Imagen de la instalación utilizada para la esterilización con COAP de tejidos NBQ y material sensible militar.

La presión y el caudal de CO<sub>2</sub> eran controlados por la acción combinada de un regulador de presión final (BPR) (Tescom, Serie 26 – 1761 – 24 - 161, Alemania) y el regulador de caudal de la bomba, respectivamente. El equipo contaba con un disco de ruptura tarado a 380 bares para evitar problemas de sobrepresión. La masa total de CO<sub>2</sub> y el caudal puntual se midieron utilizando un medidor de caudal másico (Alicat Scientific, M- 10SLPM-D, USA) conectado en la salida.

#### **5.2.8. Tratamiento de las muestras con CO<sub>2</sub>SC para la desactivación de *B.***

##### ***thuringiensis***

Se cargó el recipiente con el material a tratar en cámara de flujo laminar y se llevó al equipo de alta presión manteniendo la esterilidad. Para los ensayos con la suspensión de esporas, se utilizaron 20 mL, en los ensayos sobre tejidos del traje NBQ, se emplearon trozos de aprox. 5 g. que se introdujeron en un recipiente de 50 mL. Cuando se trató material electrónico se hizo en un recipiente de 250 mL. El recipiente correspondiente se encajó en su lugar y se ajustaron los cierres para mantener la presión de CO<sub>2</sub> en el interior. Se colocó la camisa calefactora y se esperó hasta alcanzar la temperatura de operación. En ese momento se abrió la botella de CO<sub>2</sub> y se puso la bomba en funcionamiento para alcanzar la presión de trabajo. Se abrió la válvula BPR para provocar el flujo a una velocidad de 4 g·min<sup>-1</sup> con el fin de generar turbulencia. En los primeros ensayos donde se trató la suspensión de esporas, se conectó la agitación a 500 rpm para favorecer el contacto con el CO<sub>2</sub>. El CO<sub>2</sub> entró por la parte de abajo del recipiente y atravesó la suspensión, el tejido contaminado o el material electrónico comenzando así el tiempo de operación. Trascurrido el tiempo establecido, se apagó la bomba, se cerró el suministro de CO<sub>2</sub> y comenzó la despresurización de forma muy

lenta para evitar la congelación. Una vez despresurizado y separado del equipo, el recipiente se llevó de forma estéril a la cámara de flujo laminar, donde se recogió la muestra tratada para realizar los posteriores análisis microbiológicos.

Similar procedimiento se siguió en los ensayos donde el CO<sub>2</sub> se mezcló con agua o aditivos, excepto que en esos casos el CO<sub>2</sub> después de ser bombeado a la presión de operación, pasó por el presaturador antes de entrar al recipiente donde se llevó a cabo el tratamiento de los materiales.

#### **5.2.9. Tratamientos térmicos**

Para estudiar el efecto separado de la temperatura en la inactivación de las esporas, se llevaron a cabo varios ensayos sin CO<sub>2</sub>. En estos experimentos, el procedimiento de operación fue el mismo, excepto que no hubo flujo de CO<sub>2</sub> en el recipiente donde estaban contenidos los materiales. En vez de ello, la suspensión de las esporas y los materiales se mantuvieron dentro del recipiente a la temperatura deseada por el mismo tiempo que el ensayo comparativo con CO<sub>2</sub>.

#### **5.2.10. Medida de pH**

El pH se midió durante el tratamiento con CO<sub>2</sub> mediante tiras reactivas (MERCK, España) introducidas en el recipiente, de dos rangos de pH 4,0-7,0 y 2,5-4,5.

### **5.2.11. Determinación de las propiedades de los materiales textiles tratados con COAP**

Posteriormente se enviaron al Instituto Tecnológico de la Marañosa (ITM) dependiente del Ministerio de Defensa para evaluación de las siguientes propiedades mecánicas y de permeabilidad acorde a las normas estandarizadas de este centro:

- Ensayo de tracción y desgarro
- Espesor de tejidos
- Repelencia de tejidos a los aceites
- Resistencia de tejidos al mojado superficial
- Peso por m<sup>2</sup> de tejidos y similares
- Resistencia a la penetración de simulador de agresivo químico
- Permeabilidad al aire de tejidos
- Permeabilidad al vapor de agua
- Resistencia de tejidos a la penetración de agua bajo presión
- Hidrostática
- Absorción de agua

### **5.2.12. Análisis estadístico**

Los experimentos se repitieron al menos tres veces. Los análisis microbianos se realizaron por duplicado para cada réplica ( $n = 3 \times 2$ ). Se calcularon las medias y las desviaciones estándar para todos los datos.



### 5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostrados se han agrupado en tres secciones:

- a) *Desactivación de B. thuringiensis en suspensión acuosa.* El objetivo fue evaluar el efecto de las principales variables de operación: presión, temperatura y tiempo de contacto. También se estudió el efecto de la actividad de agua porque el tratamiento tiene como objetivo final aplicarlo en materiales sólidos y la influencia de la reducción del pH exterior causada.
- b) *Desactivación de B. thuringiensis en material militar.* Partiendo de las condiciones optimizadas en la etapa anterior se investigó la eficacia del COAP en la desactivación de las esporas de *B. thuringiensis* una vez que contaminaban distintos tejidos y componentes del traje NBQ, así como material electrónico que el soldado podría llevar en campaña.
- c) *Efecto del tratamiento en las propiedades de los materiales tratados.* Dado que los trajes NBQ son muy caros, sería muy favorable para la viabilidad de la tecnología que después del tratamiento con CO<sub>2</sub> pudieran ser reutilizados. Para ello debían pasar unos ensayos mecánicos y físicos establecidos por norma, que se evaluaron. Por otro lado, el material electrónico, típicamente radios y móviles, podrían perder capacidades por el tratamiento a alta presión y temperatura. De ahí que se analizó el efecto que el tratamiento con CO<sub>2</sub> tenía en varias muestras de estos componentes.

### 5.3.1. Desactivación de *B. thuringiensis* en suspensión acuosa

#### 5.3.1.1. Efecto de la temperatura

La Figura 5.3 muestra el efecto de la temperatura en la desactivación de esporas de *B. thuringiensis* suspendidas en agua. También se incluye por motivos de comparación el grado de desactivación alcanzado cuando sólo se aplica calor para evaluar el efecto del CO<sub>2</sub> per sé.

En primer lugar, se observó que a 70°C se conseguía desactivación total (6 ciclos logarítmicos) que es el nivel aceptado como de esterilización de *B. thuringiensis* si se operaba a 350 bar. Aunque a 60°C ya se conseguían 5 log y a 50°C, 4 ciclos logarítmicos. Este hecho es muy relevante dado que para desactivar esporas con tratamiento térmico harían falta del orden de 120°C.

En segundo lugar, si se comparan los resultados obtenidos con CO<sub>2</sub> con los obtenidos con el tratamiento térmico, se comprueba que el CO<sub>2</sub> tiene efecto letal por sí mismo. Este hecho ya había sido publicado previamente por otros autores (Watanabe *et al.*, 2003, Ballestra y Cuq, 1998 y Spilimbergo *et al.*, 2003) y por nosotros en trabajos previos hechos de la desactivación de *Alycyclobacillus acidoterrestris*, según se muestra en el Capítulo 2 (Casas *et al.*, 2012) y *Bacillus cereus*, según se muestra en el Capítulo 3 (Casas y Calvo, 2013). Tan sólo a los 80°C cuando se aplicó solo calor, comenzó cierta desactivación de *B. thuringiensis*, temperatura que coincide con las típicamente establecidas para “el despertar” térmico de las esporas (Finley y Fields, 1962 y Levinson y Hyatt, 1969).

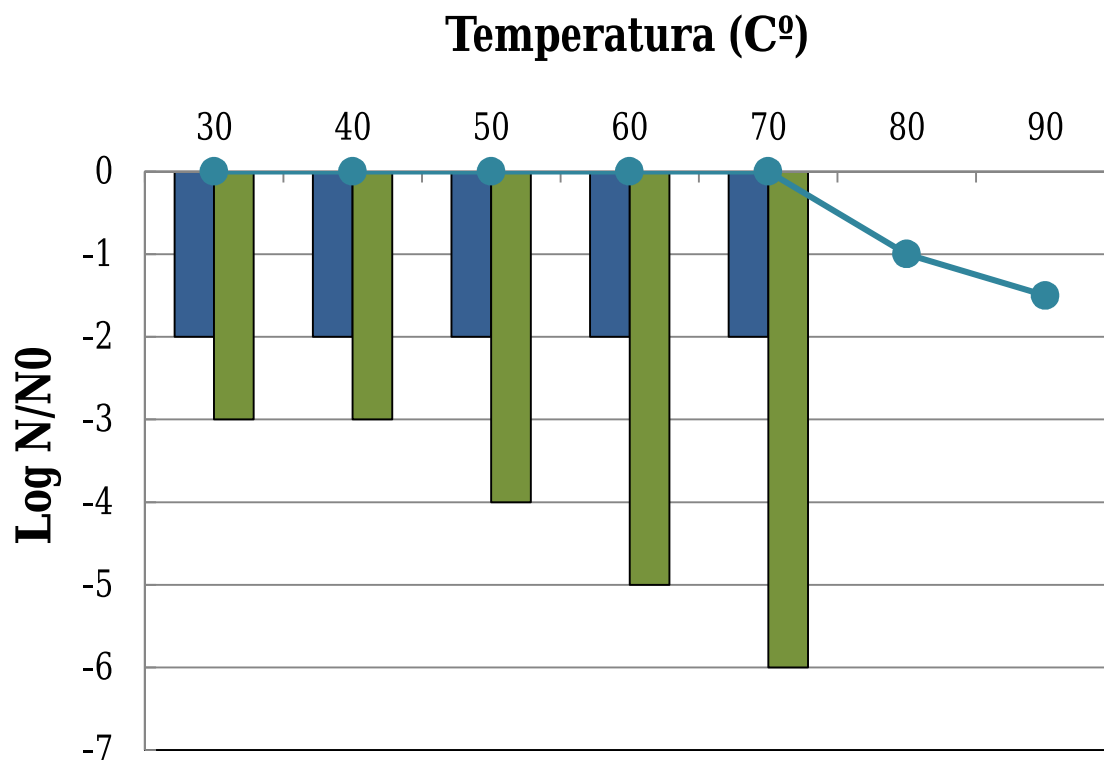
La explicación de porqué el COAP tiene efecto letal per sé podría residir en que en medios con actividad de agua alta, podría promover la activación y germinación de las esporas (Spilimbergo *et al.*, 2003 y Furukawa *et al.*, 2004) reduciendo su tolerancia al calor (Watanabe *et al.*, 2003). Este fenómeno también estaría fuertemente asociado a la reducción del pH del medio por disolución del CO<sub>2</sub>, como se demuestra después en la sección 5.3.1.3.

#### 5.3.1.2. Efecto de la presión

Como se observa en la Figura 5.3, se produjeron diferencias significativas en la desactivación de *B. thuringiensis* al aumentar la presión. Mientras que a 350 bar se consiguió la desactivación total de la espora, a las mismas condiciones pero a 100 bar sólo se lograron dos ciclos logarítmicos operando a 70°C.

Sin embargo, se ha comprobado en otros microorganismos, y especialmente en las formas esporuladas, que la presión hidrostática en los intervalos utilizados en el método con COAP no tiene efecto (Norton y Sun, 2008).

Por tanto, el impacto que tiene la presión de operación debe asociarse fundamentalmente a que facilita la solubilización del CO<sub>2</sub> en el agua rebajando el pH y a la generación de turbulencia en el medio facilitando el buen contacto, como se demuestra a continuación.



**Figura 5.3.** Desactivación de *B. thuringiensis* con CO<sub>2</sub>SC aplicado a distintas presiones y temperaturas y comparación con tratamiento térmico. Otras condiciones de operación: tiempo de tratamiento: 60 minutos, caudal de CO<sub>2</sub>: 4 g·min<sup>-1</sup>, velocidad de agitación: 500 rpm. ■ 100 bar ■ 350 bar ● presión atmosférica

#### 5.3.1.3. Efecto del pH

La solubilización del CO<sub>2</sub> en la suspensión acuosa de las esporas causó la reducción del pH a un valor entorno a 4. Para valorar el efecto de la acidificación del medio en el poder letal contra las esporas de *B. thuringiensis*, se realizaron ensayos comparativos aplicando COAP en las mismas condiciones pero utilizando un medio tamponado a pH 7. Como se observa en la Tabla 5.3 en las muestras tamponadas, solo se consiguió una reducción logarítmica frente a las seis reducciones logarítmicas de las muestras no tamponadas. Así mismo se realizaron ensayos utilizando N<sub>2</sub>O aplicado también a las

mismas condiciones. Este gas tiene propiedades críticas, físicas y químicas muy cercanas a las del CO<sub>2</sub>, sin embargo su disolución en el agua no reduce el pH. De hecho, se observó que cuando la suspensión se trató con este gas, el pH se quedó en 4,6. Consecuentemente, sólo se consiguió una reducción logarítmica. Por lo tanto hay un efecto importante del pH externo en la desactivación de las esporas de *B. thuringiensis*.

**Tabla 5.3.** Efecto del pH extracelular en la desactivación de *B. thuringiensis*. Condiciones de operación: temperatura: 70°C, tiempo de tratamiento: 60 minutos, caudal de CO<sub>2</sub>: 4 g·min<sup>-1</sup>, velocidad de agitación: 500 rpm.

Tratamiento	Presión (bar)	pH	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>
CO <sub>2</sub> + tampón	350	6,9	-1,1
CO <sub>2</sub>	350	3,9	-6,0 (Total)
N <sub>2</sub> O	350	4,6	-1,2
Disolución ácido cítrico	1	3,7	0,0

Sin embargo, cuando se realizaron ensayos en los que las esporas se suspendieron en ácido cítrico a pH similar al obtenido en el tratamiento con CO<sub>2</sub>, operando con el mismo equipo y a las mismas condiciones de temperatura y agitación (a excepción de la presión), se observó que la combinación de pH rebajado y temperatura no conseguía reducción alguna en la contaminación de *B. thuringiensis*. Ello es indicativo de que definitivamente el CO<sub>2</sub> tiene efecto esporicida per sé y que el mecanismo por el cual desactiva las esporas de *B. thuringiensis* implica varios fenómenos. Iguaes resultados se obtuvieron en la desactivación de *B. cereus* como se ha discutido Capítulo 3 y publicado previamente (Casas y Calvo, 2013).

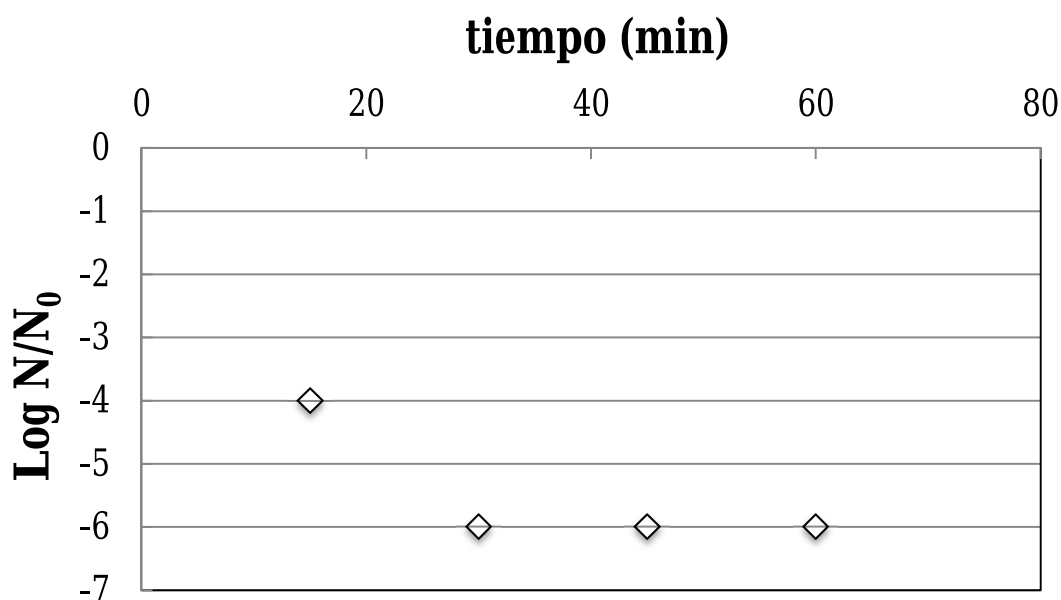
Esta variable es muy importante para la viabilidad técnica y económica del proceso,

dado que si para descontaminar ropa o utensilios militares de armas biológicas son necesarios altos tiempos de tratamiento, ello conduciría a enormes equipos y elevadísimos costes de operación que comprometerían el escalado a nivel industrial.

#### 5.3.1.4. Efecto del tiempo de operación

Los ensayos anteriores donde se conseguía una reducción de 6 ciclos logarítmicos se realizaron con una hora de operación. Lo que pretendió la siguiente investigación fue reducir ese tiempo.

En la Figura 5.4 se muestran los resultados cuando se investigaron tiempos de hasta 15 minutos. Como se observa, el tiempo de tratamiento a 350 bar y 70°C podría reducirse hasta 30 min. Por debajo de este tiempo, ya no se conseguiría desactivar totalmente la espora de *B. thuringiensis* en suspensión acuosa.



**Figura 5.4.** Desactivación de *B. thuringiensis* con COAP aplicado a distintos tiempos de tratamiento. Otras condiciones de operación: presión: 350 bar, temperatura: 70°C, caudal de CO<sub>2</sub>: 4 g·min<sup>-1</sup>, velocidad de agitación: 500 rpm.

#### 5.3.1.5. Efecto de la actividad de agua, $a_w$

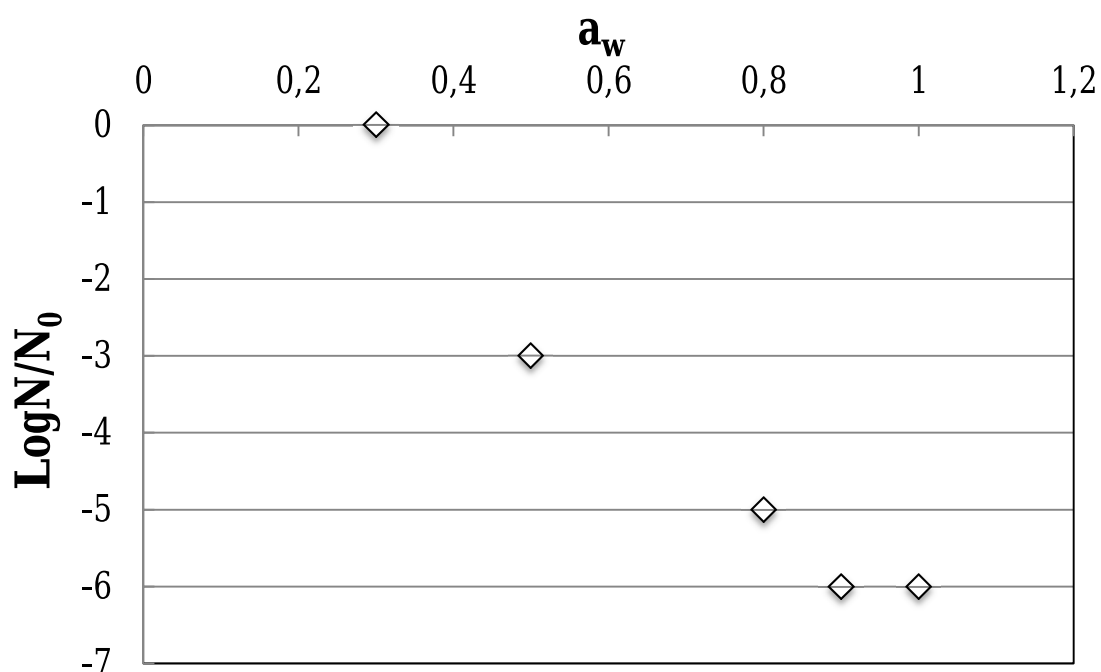
Trabajos previos en la inactivación de la carga natural microbiana de alimentos sólidos tales como cacao (Calvo *et al.*, 2007), pimentón (Calvo y Torres, 2010) y hierbas y especias (Haas *et al.*, 1989) demostraron que el CO<sub>2</sub> a alta presión sólo es esporicida en presencia de algo de agua. De la misma forma, Kamihira y colaboradores probaron que el COAP puro no era efectivo en la eliminación de esporas secas (Kamihira *et al.*, 1986), y Furukawa y colaboradores que una reducción en la actividad de agua en un sistema modelo alimentario protegía las esporas de *Geobacillus stearothermophilus* de la inactivación con CO<sub>2</sub> porque reducía la velocidad de germinación (Furukawa *et al.*, 2009). Además, la presencia de agua es necesaria para la reducción del pH, factor que como se ha demostrado es sinérgico en la desactivación.

Por tanto, dado que en este trabajo se pretendía descontaminar ropa y utensilios militares, se pensó que era imprescindible estudiar el efecto que la humedad de estos objetos podría tener en la desactivación de las esporas usadas como armas militares.

Por otro lado, en ropa técnica quizá no sería muy perjudicial tener que humectarla para que el tratamiento con CO<sub>2</sub> fuera eficaz, pero en material electrónico podría ser un serio problema en cuanto a su funcionalidad posterior.

Los primeros ensayos para evaluar el efecto de la humedad del material a tratar contaminado con *B. thuringiensis* se hicieron sobre harina de maíz. La razón es que existía en la bibliografía datos que correlacionaban la humedad de esta materia prima con su actividad de agua,  $a_w$  (Oyelade *et al.*, 2008).

Como se observa en la Figura 5.5 la desactivación de *B. thuringiensis* en esta materia prima se vió perjudicada por la disminución de la  $a_w$ . Si la materia prima estaba muy seca ( $a_w \leq 0,3$ ), entonces la desactivación del arma biológica no era posible. Tan solo cuando se llegaba a  $a_w$  del orden de 0,9, que es el valor típico necesario para la germinación de las esporas, y que corresponde a una humedad de partida del 16% en peso, se conseguía la desactivación total en este medio. Ello indica que habría que humedecer el material militar al menos a esa humedad para conseguir esterilizarlo de un arma biológica, tal y como se discute mas tarde.



**Figura 5.5.** Desactivación de *B. thuringiensis* en harina de maíz con distintas  $a_w$  mediante COAP. Otras condiciones de operación: presión: 350 bar, temperatura: 70°C, tiempo de tratamiento: 60 minutos, caudal de  $\text{CO}_2$ :  $4 \text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$ .



### 5.3.2. Desactivación de *B. thuringiensis* en tejidos de traje NBQ

Partiendo de las condiciones determinadas en la etapa anterior a continuación se investigó la eficacia del COAP en la desactivación de las esporas de *B. thuringiensis* una vez que contaminaban tejidos del traje NBQ.

Los trajes NBQ para uso militar, están pensados para proteger el torso y las extremidades de la exposición directa ante agentes químicos, biológicos y para evitar el contacto con partículas radiactivas. Suelen estar hechos de una capa exterior de color verde o de camuflaje impermeabilizado, una capa de fibras sintéticas tratadas con retardantes del fuego o aluminizadas para su uso con armas de fuego (tejido carbonizado) y con una capa interna de algodón impregnada en carbón activo (espuma de carbón activo). El conjunto se complementa con otros elementos para la protección de las extremidades como guantes de butilo y calzas (o botas) diseñadas para el fin. Para la cara es imprescindible el uso de sistemas filtrantes como las máscaras antigás o equipos de respiración autónoma (ERA), los cuales disponen de botellas de aire respirable.

#### 5.3.2.1. Optimización de la cantidad de agua

Lo primero que se hizo fue confirmar la cantidad de agua que era necesario aportar a los materiales para que fuera efectivo el tratamiento con CO<sub>2</sub>, dada la importancia que este factor tenía tal y como se demostró en los ensayos previos.

En la Tabla 5.4 se muestra la cantidad de agua medida en peso respecto el material a

tratar que era necesaria para lograr crecientes grados de desactivación de *B. thuringiensis* en tejidos de traje NBQ. Como se observa, fue necesario un porcentaje de humedad del 25% para lograr la desactivación total. Esta cantidad es mayor a la estimada cuando se trató harina de maíz contaminada con la misma espora, posiblemente porque el agua en los tejidos estaba menos disponible que en la harina de maíz y/o por la ausencia de nutrientes favorecedores de la germinación.

Por tanto, fue necesaria la presencia de agua en la operación para conseguir niveles de desactivación de *B. thuringiensis*, acordes a la normativa OTAN más exigente. Nuestra hipótesis es que el agua es necesaria para promover la germinación de las esporas y permitir que el pH baje a valores próximos a 4 que es un factor sinérgico en este proceso, como se demostró anteriormente, para posteriormente debido a la presencia de CO<sub>2</sub> y la temperatura inactivar las formas germinadas de *B. thuringiensis*.

**Tabla 5.4.** Desactivación de *B. thuringiensis* en tejido exterior de traje NBQ a distintos porcentajes de humedad. Otras condiciones de operación: presión, 350 bar; temperatura, 70°C y tiempo de operación 60 minutos.

% Agua respecto del tejido	pH	Log (N/N <sub>0</sub> )
16	5,0	-2,1
20	4,7	-4,3
23	4,5	-5,2
25	3,9	-6,0 (Total)

#### 5.3.2.2. Efecto de la adición de agua solubilizada en el CO<sub>2</sub>

La necesidad tan elevada de agua podría ser perjudicial para el tratamiento de material electrónico. Así que en este apartado, se investigó la introducción del agua junto con el

CO<sub>2</sub>. El contacto con el tejido sería mejor y se podría reducir la cantidad. Al menos el agua se introduciría de forma progresiva, evitando el mojado inicial del material.

La operación se llevó a cabo de la siguiente forma. El CO<sub>2</sub> con el agua y a presión de 350 bar y 70°C, entró al recipiente de alta presión, donde estaba introducido el material a esterilizar. A los 60 min de dicha operación se paró la bomba y se despresurizó lentamente el recipiente, recogiendo el material en cámara de flujo laminar para realizar el análisis microbiológico.

La Tabla 5.5 muestra los resultados de este tratamiento en diversos materiales NBQ contaminados con *B. thuringiensis*, repartidos en dos grupos. Los primeros se hicieron con una cantidad de agua respecto del material de aproximadamente un 40% en peso y de un 0,8% aproximadamente respecto de la masa total de CO<sub>2</sub> pasado. Esta cantidad es muy superior a la solubilidad del agua en CO<sub>2</sub> a esas condiciones, que sería del orden del 0,5 % en masa (Weibe y Gaddy, 1939). Ello fue debido al elevado caudal de CO<sub>2</sub> que además de solubilizar, arrastró agua del presaturador. A pesar de la importante cantidad de agua pasada por el tejido, mucho mayor que la utilizada en los ensayos previos mojando el material, no se logró más que dos ciclos logarítmicos de reducción de las esporas. Sin embargo, el pH dentro del esterilizador se quedó en 5,8 y como ya se demostró anteriormente para que las esporas de *B. thuringiensis* muriesen era necesario que el pH se rebajase a menos de 4.

Por este motivo se decidió incrementar la proporción de agua introducida al 59% en peso respecto del tejido colocado en el esterilizador, siendo de un 1,2% respecto de la masa del CO<sub>2</sub> pasado. Al pasar esta cantidad de agua con el CO<sub>2</sub> causó que el pH se

redujera a 3,9, condición a la cual las esporas de *B. thuringiensis* fueron totalmente desactivadas.

Sin embargo, como la cantidad de agua que había que pasar era tan alta y no se correspondía con el 25% que se había detectado como óptimo en los ensayos previos realizados mojando el tejido, se probó a reducir el tiempo de operación, que por ende reducía el agua pasada por el tejido.

**Tabla 5.5.** Desactivación de *B. thuringiensis* en materiales de NBQ con COAP y agua. Otras condiciones de operación: presión, 350 bar; temperatura, 70°C, caudal de CO<sub>2</sub>, 4 g min<sup>-1</sup>; tiempo de operación, 60 min.

Material	pH	% Agua respecto CO <sub>2</sub>	% Agua respecto tejido	log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>
Tejido carbonizado I	5,8	0,8	40,0	-2,2
Tejido carbonizado II	5,8	0,8	40,0	-2,3
Espuma carbón activo	5,8	0,8	40,0	-2,2
Tejido exterior	5,8	0,8	40,0	-2,6
Guante	5,8	0,8	40,0	-2,4
Calza	5,8	0,8	40,0	-2,3
Tejido carbonizado I	3,9	1,2	59,2	-7,0 (Total)
Tejido carbonizado II	3,9	1,2	59,2	-7,0 (Total)
Espuma carbón activo	3,9	1,2	59,2	-7,0 (Total)
Tejido exterior	3,9	1,2	59,2	-7,0 (Total)
Guante	3,9	1,2	59,2	-7,0 (Total)
Calza	3,9	1,2	59,2	-7,0 (Total)

La Tabla 5.6 muestra los resultados obtenidos sobre uno de los tejidos NBQ con CO<sub>2</sub> húmedo a decrecientes tiempos de operación. También incluye el agua que durante ese

tiempo fue pasada junto con el CO<sub>2</sub> y lo que esa cantidad significaba en porcentaje en peso respecto del CO<sub>2</sub> y del tejido colocado en el esterilizador.

Como se observa, en tiempos de operación de 60 y 30 minutos la cantidad de agua que se introdujo, fue suficiente para rebajar el pH hasta valores próximos a 4, consiguiendo una desactivación total. Sin embargo, se observa que con 15 minutos de operación, el pH solo disminuyó hasta 4,5 y por tanto, la desactivación fue de tan sólo 3 reducciones logarítmicas.

Por tanto, se confirma la importancia de un pH bajo para lograr la desactivación de *B. thuringiensis* y por otro lado, la necesidad de aportar una cantidad de agua entre 19 y 35% (en los ensayos previos mojando el material era del 25%) para conseguirlo. En estas condiciones, el tiempo de operación sería 30 min, que es un periodo razonable y del orden de los tratamientos convencionales.

**Tabla 5.6.** Desactivación de *B. thuringiensis* en materiales NBQ con COAP a distintos tiempos de tratamiento. Otras condiciones de operación: presión, 350 bar; temperatura, 70°C, caudal de CO<sub>2</sub>, 4 g min<sup>-1</sup>; cantidad de agua en el presaturador, 4g.

Tiempo de operación (min)	Agua introducida (g)	% Respecto tejido	pH	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>
60	3,0	59,2	3,9	-7,0 (Total)
30	1,7	34,6	3,9	-7,0 (Total)
15	0,9	18,8	4,5	-3,1

5.3.2.3. Tratamiento con CO<sub>2</sub> saturado en agua acidificada*Ensayos con ácido cítrico*

En el continuado intento de rebajar la cantidad de agua y dada la importancia que tiene el pH, en este grupo de ensayos, se probó a tratar el tejido exterior NBQ con el CO<sub>2</sub> mezclado con agua pero acidificada con ácido cítrico, que es un ácido orgánico poco agresivo y nada tóxico ya que incluso se utiliza como aditivo conservante alimentario. Inicialmente se utilizó la cantidad necesaria para rebajar el pH al que se había medido en los ensayos con CO<sub>2</sub>, que fue de 3,9. Esta cantidad resultó ser del  $1,4 \cdot 10^{-3}$  % respecto del agua, del  $1,0 \cdot 10^{-4}$  % respecto del tejido y de  $3,0 \cdot 10^{-5}$  % respecto del CO<sub>2</sub>. Los resultados se muestran en la Tabla 5.7.

**Tabla 5.7.** Impacto de la adición de agua acidificada con ácido cítrico al CO<sub>2</sub> en la desactivación de esporas de *B. thuringiensis* en tejido exterior NBQ en diferentes condiciones de operación. El tiempo de tratamiento se mantuvo en 15 min y se introdujo aproximadamente un 30% en peso de agua. El pH se fijó en 3,9.

Presión	Temperatura	LogN·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>
350	70	-7,0
150	70	-7,0
150	40	-3,3
150	50	-4,2
150	60	-7,0

Como se observa, la adición de agua acidificada manteniendo su proporción en el orden del 30% respecto del peso de tejido, no solo fue capaz de desactivar totalmente las esporas, sino que permitió rebajar la agresividad de las condiciones de operación para conseguirlo, hecho que es clave para reducir el impacto en la calidad de los materiales tratados y para reducir los costes tanto de la instalación como de consumo de energía. Así, a condiciones tan suaves de 150 bar, 60°C y 15 min sería posible descontaminar tejidos NBQ infectados con esporas de armas biológicas.

La Tabla 5.8 muestra los resultados obtenidos aplicando este mismo tratamiento a una Memoria USB al que previamente se había atomizado una suspensión acuosa de esporas hasta alcanzar una contaminación del orden  $10^6$  ufc g<sup>-1</sup>. Como se observa, el tratamiento también fue eficaz en este material electrónico, incluso cuando el agua introducida en el CO<sub>2</sub> suponía menos de un 20% en peso respecto de la Memoria USB. Es más, cuando se adicionó cantidad suficiente de ácido cítrico para rebajar el pH a 3,3, se logró la muerte de las esporas a tan sólo 40-45°C.

La idea de utilizar un pH de 3,3 es porque éste sería el valor teórico de acidez si el CO<sub>2</sub> se solubilizara perfectamente en el agua formando ácido carbónico. Es decir, sería la acidez del agua saturada en CO<sub>2</sub>, que se podría conseguir con un buen sistema de introducción y dispersión del mismo. Por otro lado, este grado de acidez no se espera que tenga gran impacto en la corrosión de los materiales de construcción de los equipos. El acero inoxidable 316, del que normalmente se hacen los recipientes para tratamiento con CO<sub>2</sub>, resiste hasta pH de 2.

**Tabla 5.8.** Impacto de la adición de agua acidificada con ácido cítrico al CO<sub>2</sub> en la desactivación de esporas de *B. thuringiensis* que contaminaban una Memoria USB a diferentes pH y decrecientes temperaturas. La presión de operación fue de 150 bar y el tiempo de tratamiento de 15 min, lo que permitió introducir un total de alrededor del 20% en peso de agua respecto de la Memoria USB. En la tabla se indican las proporciones del ácido respecto del disolvente y de la Memoria USB.

Temperatura (°C)	pH	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Fracción en volumen CO <sub>2</sub> (%)	Fracción en masa CO <sub>2</sub> (%)	Fracción en masa Memoria USB (%)
60	3,9	-6,0 (Total)	0,27	0,33	2,0
50	3,9	-6,0 (Total)	0,27	0,33	2,0
45	3,3	-6,0 (Total)	0,30	0,37	2,2
40	3,3	-5,9	0,30	0,37	2,2

#### *Ensayos con ácido peracético*

El ácido peracético o peroxiacético (APA) es un fuerte agente oxidante que en agua descompone dando peróxido de hidrógeno y ácido acético. Se utiliza en la desinfección de superficies, paredes, utensilios y equipos hospitalarios porque es eficaz en cantidades muy pequeñas en la eliminación de bacterias (< 200 ppm), virus (< 2000 ppm) y esporas (< 0,3%) a temperatura ambiente en tiempos del orden de minutos (Block, 2001).

En trabajos previos, este ácido dio buenos resultados como aditivo del CO<sub>2</sub> supercrítico. Añadido en cantidades de 55 ppm causó la esterilización de esporas de *B. atrophaeus* en 30 min, de virus porcinos en 120 min y de varios hongos (*penicillium*, *aspergillus* y *verticillim*) inoculados en un biomaterial en tan solo 15 min, suministrando el CO<sub>2</sub> a 100 bar y 41°C (Qiu *et al.*, 2009). También resultó eficaz en la inactivación de esporas de *G. stearothermophilus* (White *et al.*, 2006).



Nosotros añadimos el ácido peracético al agua para conseguir valores de pH decrecientes desde 3,9 a 3,3 por las mismas razones que las expuestas en los ensayos con ácido cítrico. Los resultados se muestran en la Tabla 5.9.

Como se observa, el APA fue incluso más eficiente que el ácido cítrico porque a menor proporción en el disolvente (870 vs. 3000 ppm) permitió la total desactivación de las esporas en la Memoria USB a 40°C en los 15 min de tratamiento. Con 650 ppm (equivalente a un pH de 3,9) lo logró a 45 °C. Ello seguramente sea debido a que el APA, además de bajar el pH ejerce una acción oxidante. Por ello, estas cantidades son un orden de magnitud inferior a las necesarias cuando se aplica sin CO<sub>2</sub>.

**Tabla 5.9.** Impacto de la adición de agua acidificada con ácido peracético al CO<sub>2</sub> en la desactivación de esporas de *B. thuringiensis* que contaminaban una Memoria USB a diferentes pH y decrecientes temperaturas. La presión de operación fue de 150 bar y el tiempo de tratamiento de 15 min, lo que permitió introducir un total de alrededor del 20% en peso de agua respecto de la Memoria USB. En la tabla se indican las proporciones del ácido respecto del disolvente y de la Memoria USB.

Temperatura (°C)	pH	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Fracción en volumen CO <sub>2</sub> (%)	Fracción en masa CO <sub>2</sub> (%)	Fracción en masa Memoria USB (%)
50	3,9	-6,0 (Total)	0,065	0,05	0,30
45	3,9	-6,0 (Total)	0,065	0,05	0,30
40	3,9	-5,2	0,065	0,05	0,30
40	3,3	-6,0 (Total)	0,087	0,07	0,40

Recientemente, Setlow y colaboradores publicaron evidencias sobre el mecanismo de inactivación del CO<sub>2</sub> más ácido peracético en esporas de *Bacillus subtilis* comparando

entre ensayos realizados en seco y en presencia de agua (Setlow *et al.*, 2015). Concluyeron que esta mezcla inactiva las esporas dañando la membrana interna de las esporas. Las proteínas protectoras de ADN proporcionaron resistencia al tratamiento sólo en esporas secas. Quizá sea ésta la razón por la cual la presencia de agua sea favorable a la inactivación.

#### 5.3.2.4. Tratamiento con CO<sub>2</sub> saturado en agua modificada con otros aditivos

##### *Ensayos con peróxido de hidrógeno*

En estos ensayos se probó otro oxidante que no rebaja el pH, el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Las disoluciones a relativas altas concentraciones de 10-25% tienen actividad esporicida. Aunque en las aplicaciones prácticas con este fin, se utiliza a alta temperatura. Por ejemplo, en el empaquetamiento aséptico se aplica peróxido de hidrógeno al 35% a 80°C durante 3 a 9 segundos. En fase vapor, es un esporicida efectivo a temperaturas que oscilan entre 4 y 80 °C con concentraciones que varían de 0,5 a 10 mg L<sup>-1</sup> (Block, 2001).

Como aditivo del CO<sub>2</sub> fue probado en esporas de *Ántrax*, consiguiendo su esterilización con 200 ppm operando a 275 bar y 40°C en 4 h (Zhang *et al.*, 2007). Los autores estudiaron el mecanismo de actuación de la mezcla y observaron que no había indicios de germinación y que las esporas estaban prácticamente intactas, sin apenas liberación de ácido dipicolínico al medio que indicara que la barrera de permeabilidad de la spora estuviera rota. Lo que observaron era que aproximadamente la mitad de las esporas inactivadas habían perdido la integridad de la membrana.

La mezcla CO<sub>2</sub> mas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue también exitosa en la inactivación completa de esporas de *B. atrophaeus* inoculadas en estructuras tridimensionales de biomateriales utilizados para implantes, en concentraciones que oscilaban entre 200 y 1250 ppm dependiendo de si el tratamiento era mas (4 h) o menos (2 h) prolongado, pero en ambos casos operando a temperaturas muy suaves de 35-37 °C (Ellis et al., 2010, Herdegen et al., 2014). En cantidades de 600 ppm a 40 °C y 120 min, logró la inactivación de esporas de *G. stearothermophilus* en materiales termoset (Donati et al., 2012).

El CO<sub>2</sub> mezclado con agua, peróxido de hidrógeno y anhídrido acético (0,25% agua, 0,15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,5% anhídrido acético) permitió la eliminación a 38°C de tres tipos distintos de esporas (*G. stearothermophilus*, *B. atrophaeus* y *B. cereus*) que contaminaban estructuras de agarosa/alginato bioresorbibles y de colágeno mineralizado (Bernhardt et al., 2015).

Los resultados de la Tabla 5.10 muestran que aunque el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua (10% en fracción en masa de agua) fue bastante eficiente como modificador del COAP, no lo fue tanto como el ácido peracético, apuntando una vez mas a la importancia de la reducción del pH externo en la desactivación de las esporas. En cualquier caso, la concentración esporicida fue de 160 ppm que es mucho menor que la necesaria en condiciones ambientales o incluso que la necesaria cuando no hay agua en el medio.

El interés de estos ensayos residía en la posibilidad de combinar el tratamiento de eliminación de armas biológicas con la limpieza del traje NBQ. Ya es comercial el proceso de limpieza en seco con CO<sub>2</sub> a alta presión (Tersus solutions, 2017). Se trata de estudiar si se podría llegar a un compromiso en las condiciones de operación para que

ambos procesos se pudieran llevar a cabo de forma simultánea. Ello supondría que el traje NBQ podría reutilizarse con importantes ahorros.

**Tabla 5.10.** Impacto de la adición de agua modificada con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10% en fracción en masa de agua) al  $\text{CO}_2$ , en la desactivación de esporas de *B. thuringiensis* que contaminaban una Memoria USB. La presión de operación fue de 150 bar y el tiempo de tratamiento de 15 min, lo que permitió introducir un total de alrededor del 20% en peso de agua respecto de la Memoria USB. En la tabla se indican las proporciones del  $\text{H}_2\text{O}_2$  respecto del COAP y de la Memoria USB.

Temperatura (°C)	pH	Log $N \cdot N_0^{-1}$	Fracción en volumen $\text{CO}_2$ (%)	Fracción en masa $\text{CO}_2$ (%)	Fracción en masa Memoria USB (%)
45	4,0	-6,8	0,16	0,17	1,0

#### *Ensayos con alcohol isopropílico*

En las dos últimas décadas se ha introducido el  $\text{CO}_2$  como un disolvente para la limpieza en seco de tejidos para sustituir al percloroetileno (PERC) y disolventes de origen petrolífero que presentan riesgos tanto de seguridad como de salud, y son dañinos para el medio ambiente. Ello es debido a que a alta presión en condiciones sub y supercríticas, presenta muy buenas propiedades de transferencia de materia facilitando la penetración en matrices sólidas y también alta capacidad de solvatación. De ahí que sea capaz de extraer compuestos lipídicos tales como manchas de grasas. Es fácil de eliminar una vez finalizado el proceso de limpieza puesto que a condiciones ambientales es un gas.

La limpieza en seco, hoy se lleva a cabo a presión de 50-70 bar y a temperatura entre 10 y 20°C, es decir en condiciones donde el CO<sub>2</sub> es aún un líquido (Pallado *et al.*, 2001). Se utiliza junto con pequeñas concentraciones de potenciadores del lavado, como son los surfactantes y/o co-solventes. Las moléculas de surfactante son las responsables de la eliminación de las partículas de suciedad de la prenda textil (van Roosmalen *et al.*, 2004). En cuanto a los cosolventes, su misión es aumentar la solubilidad de las manchas polares. Además de una pequeña cantidad de agua (0.4 %) el más adecuado es el alcohol isopropílico o isopropilalcohol (IPA) en concentraciones de aproximadamente un 4% (van Roosmalen *et al.*, 2003).

Una vez puestos en contacto las prendas a limpiar con los aditivos y el disolvente, se mantiene el sistema en agitación en el interior del recipiente (un tambor similar a las lavadoras convencionales) del orden de 30 a 45 minutos que es la mitad de los procedimientos convencionales. Después se descomprime la "lavadora" para recoger el material limpio. El CO<sub>2</sub> se almacena, se comprime y recircula para iniciar un nuevo proceso de lavado. Los tejidos muestran menos pérdida de color, de cambio de dimensiones, de fibras y tiñen menos a otros tejidos que los lavados mediante el proceso convencional con percloroetileno (De Walle y Den Otter, 2005).

Se ha demostrado que la operación en estas condiciones y debido a la presencia de IPA, permite desactivar bacterias patógenas. Por ejemplo, en un estudio sobre prendas de algodón contaminadas con *E. coli*, se demostró que introduciendo un 5% en fracción en volumen de IPA en CO<sub>2</sub> fue suficiente para la mortalidad completa de esta bacteria a tan solo 70 bar y 20°C (Schmidt *et al.*, 2005). Aunque el IPA no tiene actividad esporicida per sé, nosotros encontramos que al introducir este alcohol (puro) con el CO<sub>2</sub> permitió

una reducción de cinco ciclos logarítmicos en la contaminación de las esporas de *B. thuringiensis* en el tejido exterior del traje NBQ. Las condiciones de operación fueron 150 bar, 70°C y 15 min. Pero observamos que el pH se quedó en 4,7 dado que el IPA es un compuesto de pK elevado.

Cuando se introdujo mezclado con agua (al 5% en fracción en masa de agua) los resultados fueron mejores como se muestra en la Tabla 5.11 en ensayos hechos sobre una Memoria USB. Probablemente porque el agua favoreció la germinación de las esporas y el IPA actuó como bactericida.

**Tabla 5.11.** Impacto de la adición de agua modificada con IPA, al CO<sub>2</sub> en la desactivación de esporas de *B. thuringiensis* que contaminaban una Memoria USB. La presión de operación fue de 150 bar y el tiempo de tratamiento de 15 min, lo que permitió introducir un total de alrededor del 20% en peso de agua respecto de la Memoria USB. En la tabla se indican las proporciones de IPA respecto del disolvente y de la Memoria USB.

Temperatura (°C)	pH	Log N·N <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	Fracción en volumen CO <sub>2</sub> (%)	Fracción en masa CO <sub>2</sub> (%)	Fracción en masa Memoria USB (%)
45	4,7	-6,0 (Total)	0,29	0,17	1,0
40	4,7	-5,9	0,29	0,17	1,0

### 5.3.3. Análisis de calidad de los materiales tratados

#### 5.3.3.1. Calidad de los trajes NBQ tratados en seco y en húmedo

Primero se analizaron las muestras de los diversos tejidos y elastómeros tratados con CO<sub>2</sub> en las condiciones optimizadas para el tratamiento, es decir a 70°C y 350 bar por tiempo de 60 min. Se hicieron con los materiales secos y mojados. Las razones de hacerlo en húmedo están relacionadas con lo expuesto sobre la importancia de la presencia de agua para la desactivación de las esporas de *B. thurigiensis*.

En general, las modificaciones visuales y de tacto observadas al tratar los materiales textiles con COAP eran exiguas, incluso cuando eran mojadas previamente, como se describe en detalle en la Tabla 5.12. Además, las escasas deformaciones vistas en los materiales elastoméricos (guantes y calzas) tales como aumento de tamaño en alguna muestra húmeda y formación de burbujas prácticamente desaparecieron a las 24 horas. Ello es debido a que estaban ocasionadas fundamentalmente por CO<sub>2</sub> gas atrapado que poco a poco se fue liberando. En la Figura 5.6 se muestra la deformación en el tamaño del guante, y en la Figura 5.7 se muestra la formación de pequeñas burbujas las calzas.

Por otro lado, los ensayos sobre propiedades mecánicas y físico-químicas realizadas por el Instituto Tecnológico de la Marañosa (ITM) indicaron que en:

- **Tejidos**, no se apreciaba un cambio significativo en ensayos fundamentales para trajes NBQ como permeabilidad al aire, permeabilidad al vapor de agua y

tracción-desgarro al comparar tejido sin tratar y tejido tratado con CO<sub>2</sub> supercrítico tanto en presencia como en ausencia de agua.

- **Elastómeros**, se observó una pérdida de resistencia a la tracción tras el tratamiento tanto seco como húmedo en guantes, pero no en calzas, donde los datos obtenidos no mostraban un cambio significativo entre muestras tratadas con CO<sub>2</sub> supercrítico y las no tratadas.

**Tabla 5.12.** Efecto del tratamiento con COAP en seco y en húmedo sobre diversos materiales textiles y poliméricos del atuendo militar.

Material	Seco/Mojado	Modificaciones observadas
Tejido carbonizado 1	seco	No se observan diferencias
Tejido carbonizado 2	seco	Parece que se oscurece
Espuma carbon activo	seco	No se observan diferencias
Tejido exterior	seco	No se observan diferencias
Guante	seco	Parece que la goma esta más blanda al salir del extractor y se observan algunas burbujas, pero despues de 24 horas han desaparecido practicamente
Caucho Calza	seco	No se observan diferencias
Tejido carbonizado 1	mojado	No se observan diferencias
Tejido carbonizado 2	mojado	No se observan diferencias
Espuma carbón activo	mojado	No se observan diferencias
Tejido exterior	mojado	No se observan diferencias
Guante	mojado	Aumenta de tamaño, la goma esta más blanda al salir del extractor y se observan algunas burbujas pero despues de 24 horas han desaparecido practicamente y ha disminuido el tamaño al original
Caucho Calza	mojado	Se observan manchas blancas probablemente debido a la cal del agua

Similares resultados se obtuvieron en todas las muestras de los trajes NBQ tratadas con CO<sub>2</sub> saturado en agua normal y en agua acidificada en las condiciones indicadas en las Tablas 5.6 y 5.7. No se detectaron modificaciones significativas ni en su aspecto ni en sus propiedades mecánicas y de permeabilidad. Aunque en este caso, debido al paso de CO<sub>2</sub>, las muestras salieron prácticamente secas.

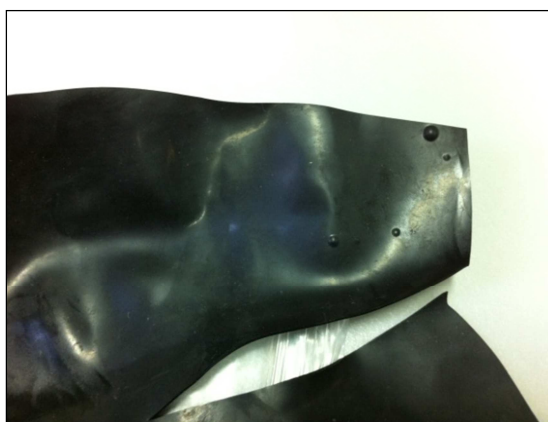
Los soldados en combate suelen llevar distintos dispositivos electrónicos para su



comunicación, que en caso de ataque por arma biológica también quedarían contaminados y deberían desecharse como residuos peligrosos con el coste asociado. Por ello, se investigó el efecto que el tratamiento de CO<sub>2</sub> provocaba en el aspecto y funcionalidad de móviles, radios y pendrives.



**Figura 5.6.** Muestra de guante tratado con CO<sub>2</sub> deformado que luego recuperó su tamaño original.



**Figura 5.7.** Muestra de guante tratada con CO<sub>2</sub> con burbujas causada por el atrapamiento de este gas.

A estos materiales electrónicos se les sometió a distintos tratamientos con CO<sub>2</sub>, es decir, en seco, humedeciendo la parte externa y utilizando CO<sub>2</sub> saturado de agua normal y acidificada en intervalos de presión comprendidos entre 150 y 350 bar y a temperaturas entre 40 y 70°C.

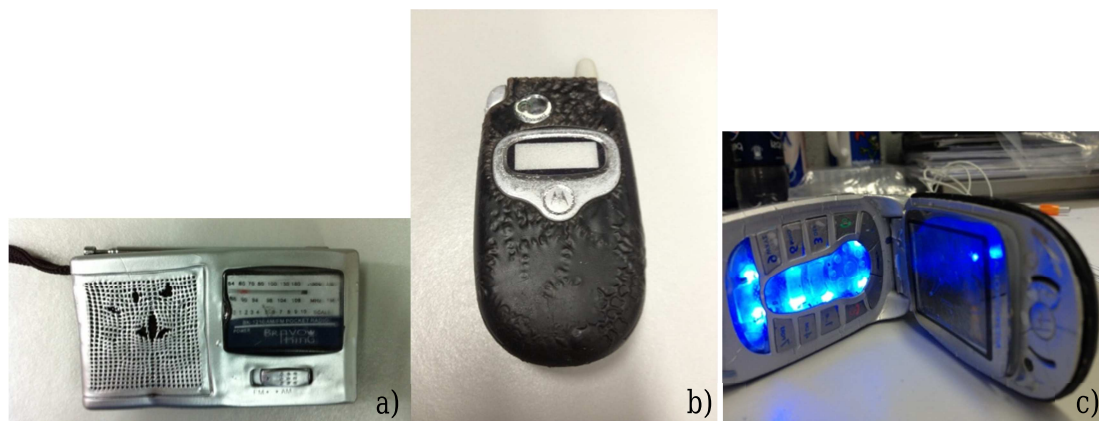
### 5.3.3.2. Calidad del material electrónico tratado

En general, se observó que los materiales electrónicos salían con desperfectos en los tratamientos a mayor temperatura y que eran independientes de la presión de operación, que era bien resistida por todos los materiales. Las deformaciones se observaban sobre todo en las carcasas plásticas tal como se muestra en las imágenes de la Figura 5.8 de una radio y un móvil tratados con CO<sub>2</sub> a 350 bar y 70°C por una hora (imagen a) y 30 min (imagen b), respectivamente. La radio no tuvo modificaciones significativas y funcionó hasta el tratamiento a 60°C, pero el móvil incluso se encendió después del tratamiento a 70°C como se muestra en la imagen c.

En la Figura 5.9 se muestra una imagen de un móvil tratado en las condiciones en las que era posible descontaminar tejidos de traje NBQ infectados con esporas de armas biológicas utilizando CO<sub>2</sub> saturado en agua acidificada con ácido cítrico a pH 3,9, que fueron 150 bar, 60°C y 15 min.

Como se puede observar, en este caso por el corto tiempo de tratamiento necesario, las deformaciones del móvil fueron mínimas. Tan solo se observó un ligero hinchamiento en las patillas de cierre de la tapa, construidas de material plástico. El móvil se encendió después con normalidad.

En la Figura 5.10 se muestra una fotografía del pendrive tratado con el CO<sub>2</sub> y sus modificadores en todas las condiciones de presión y temperatura mostradas en las Tablas 5.8 a 5.11.



**Figura 5.8.** a) Radio tratada con CO<sub>2</sub> a 350 bar, 70°C y 60 min; b) móvil tratado con COAP saturado en agua a 350 bar, 70°C y 30 min; c) el mismo móvil encendido después del tratamiento.



**Figura 5.9.** Aspecto de un teléfono móvil después del tratamiento con COAP saturado en agua acidificada a 150 bar, 60°C por 15 min.



**Figura 5.10.** Aspecto de un pendrive sometido a varios tratamientos con CO<sub>2</sub> modificado con ácido peroxiacético y agua introducido a 150 bar y temperaturas comprendidas entre 40 y 60°C.

Como se observa, después de todos estos ensayos no presentaba alteraciones importantes, excepto un leve despegamiento de parte de la carcasa plástica por el hinchamiento de la goma que lo sujetaba, que prácticamente desapareció a las 24 horas. Es más, mantuvo su capacidad funcional plenamente. El móvil se encendió después de los tratamientos a los que fue sometido y los archivos que contenía el pendrive eran accesibles, se podían abrir y manipular. Mismos resultados se obtuvieron al tratar un pendrive con COAP modificado con agua y peróxido de hidrógeno a 100 bar, 50°C por 45 min (Shieh et al., 2009).

#### **5.4. CONCLUSIONES**

Es posible descontaminar material militar contaminado con armas biológicas resistentes de tipo esporulado mediante COAP a niveles de esterilización de acuerdo a los estándares más restrictivos de la OTAN.

La presencia de agua en proporciones que oscilan entre el 20-30% de peso respecto del material a tratar es imprescindible para lograrlo. Ello es debido a que junto a un calentamiento moderado favorece la germinación de las esporas haciéndolas más sensibles a la desactivación del CO<sub>2</sub>. También contribuye a la disolución del CO<sub>2</sub> causando una reducción del pH que es un parámetro clave para conseguir la esterilización a condiciones menos agresivas, probablemente porque un medio ácido dificulta el crecimiento (Russel *et al.*, 1999 y McDonnell, 2007) e incluso inhibe la síntesis de proteínas que necesariamente se deben producir para la germinación (Andras *et al.*, 2010).

Así, si se utiliza CO<sub>2</sub> saturado en agua acidificada, se puede lograr la desactivación de hasta siete ciclos logarítmicos de esporas de bacterias que se podrían utilizar como armas biológicas, a 150 bar y tan sólo 60°C en un breve periodo de tiempo de 15 min. Si el ácido es peroxiacético esta temperatura se puede rebajar a 40°C.

Estas condiciones permitirían preservar la calidad de los materiales tratados, hecho que es muy importante para reutilizarlos. Ahora no se puede porque una vez contaminados deben tratarse como residuos biológicos peligrosos. Ello supone pérdidas en dos sentidos, los equipos que se pierden son caros y su tratamiento para descontaminarlos también lo es. También sería aplicable a componentes electrónicos.

Aunque los ensayos se han hecho sobre esporas de una bacteria, el tratamiento sería seguramente efectivo para la desactivación de otros microorganismos que se podrían utilizar como potenciales armas biológicas, tales como algunas bacterias y sobre todo virus, dado que su resistencia al tratamiento con COAP es en general mucho menor como se concluye en la bibliografía especializada.

Dicho proceso se podría aplicar también a Equipos de Protección Individual (EPIs) de otros colectivos que intencionadamente o no, pueden estar en contacto con agentes biológicos tales como el sanitario, el de bomberos, de protección civil, así como para de laboratorios de biotecnología, agrarios, veterinarios y de cocinas, o en plantas de eliminación de residuos, etc.

Las instalaciones de tratamiento podrían diseñarse para gran escala con el objetivo de limpiar y esterilizar regularmente o como unidades móviles que podrían desplazarse y

utilizarse en campaña militar donde hay mas riesgo de contaminación por ataque con arma biológica.

## 5.5. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el Ministerio de Defensa del Gobierno de España. Se agradece el apoyo en el análisis de calidad de los materiales textiles al Instituto Tecnológico “La Marañosa”

## 5.6. REFERENCIAS

- András, C.D., Csajági, C., Orbán, C.K., Albert, C., Abrahám, B., Miklóssy, I., 2010. A possible explanation of the germicide effect of carbon dioxide in supercritical state based on molecular-biological evidence. *Med. Hypotheses* 74, 325–9.
- Bae, Y.Y., Lee, H.J., Kim, S.A., Rhee, M.S., 2009. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice by supercritical carbon dioxide. *Int. J. Food Microbiol.* 136, 95–100.
- Baillie, L.W.J., 2006. Past, imminent and future human medical countermeasures for anthrax. *J. Appl. Microbiol.* 101, 594–606.
- Ballestra, P., Cuq, J.-L., 1998. Influence of Pressurized Carbon Dioxide on the Thermal Inactivation of Bacterial and Fungal Spores. *LWT - Food Sci. Technol.* 31, 84–88.
- Bertolini, G., Bertucco, A., Rassu, M., Vezzù, K., 2009. Dense CO<sub>2</sub>: an innovative method for sterilization of venous catheters at low temperature. F. Cansell, J. Mercadier, J. fages (Eds.), *Proc. 9th Int. Symp. Supercrit. Fluids* 184.

- Buzrul, S., Alpas, H., Bozoglu, F., 2005. Use of Weibull frequency distribution model to describe the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by high pressure at different temperatures. *Food Res. Int.* 38, 151–157.
- Calvo, L., Muguerza, B., Cienfuegos-Jovellanos, E., 2007. Microbial inactivation and butter extraction in a cocoa derivative using high pressure CO<sub>2</sub>. *J. Supercrit. Fluids* 42, 80–87.
- Calvo, L., Torres, E., 2010. Microbial inactivation of paprika using high-pressure CO<sub>2</sub>. *J. Supercrit. Fluids* 52, 134–141.
- Casas, J., Valverde, M.T., Marín-Iniesta, F., Calvo, L., 2012. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high pressure CO<sub>2</sub> in apple cream. *Int. J. Food Microbiol.* 156, 18–24.
- Casas, J., Calvo, L., 2013. Inactivation of spores by high pressure CO<sub>2</sub>. *Proceeding 6th Int. Symp. High Press. Process Technol.* Belgrade, Serbia, Sept. 8-11.
- Chen, C.-M., Tsai, L., Chiu, Y.-H., 2006. Inactivation of virus activity from biological material. M. Goto, T. Adschiri, B. Han, Y-W. Lee (eds), *Proc. 8th Int. Symp. Supercrit. Fluids* PB2-51.
- Cinquemani, C., Bach, E., Schollmeyer, E., 2007. Using compressed CO<sub>2</sub> and ozone for inactivating pathogenic germs- A novel sterilisation process for medical(bio-) polymers. *Proceeding 5th Int. Symp. high Press. Process Technol. Chem. Eng.*
- Cinquemani, C., Boyle, C., Bach, E., Schollmeyer, E., 2007. Inactivation of microbes using compressed carbon dioxide—An environmentally sound disinfection process for medical fabrics. *J. Supercrit. Fluids* 42, 392–397.

- Damar, S., Balaban, M.O., 2006. Review of Dense Phase CO<sub>2</sub> Technology: Microbial and Enzyme Inactivation, and Effects on Food Quality. *J. Food Sci.* 71, R1–R11.
- De Walle, FB., Den Otter FB., DETECTIVE final report: LCO<sub>2</sub> textile cleaning. Demonstration pilot scale testing of textile dry-cleaning with sub/supercritical carbon dioxide; 2005
- Dillow, A.K., Dehghani, F., Hrkach, J.S., Foster, N.R., Langer, R., 1999. Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 10344–10348.
- Donati, I., Benincasa, M., Foulc, M.-P., Turco, G., Toppazzini, M., Solinas, D., Spilimbergo, S., Kikic, I., Paoletti, S., 2012. Terminal Sterilization of BisGMA-TEGDMA Thermoset Materials and Their Bioactive Surfaces by Supercritical CO<sub>2</sub>. *Biomacromolecules* 13, 1152–1160.
- Enomoto, A., Nakamura, K., Hakoda, M., Amaya, N., 1997. Lethal effect of high-pressure carbon dioxide on a bacterial spore. *J. Ferment. Bioeng.* 83, 305–307.
- Erlendur Helgason, 1, 2 Ole Andreas Økstad, 1, 2 Dominique A. Caugant, 3 Henning A. Johansen, 1 Agnes Fouet, 4 Michéle Mock, 4 Ida Hegna, 1, 2 and Anne-Brit Kolstø1, 2, 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—One Species on the Basis of Genetic Evidence. *Appl Env. Microbiol.* 66, 2627–2630.
- Fages, J., Poirier, B., Barbier, Y., Frayssinet, P., Joffret, M.L., Majewski, W., Bonel, G., Larzul, D., n.d. Viral inactivation of human bone tissue using supercritical fluid extraction. *ASAIO J.* 44, 289–93.



- Finley, N., Fields, M.L., 1962. Heat activation and heat-induced dormancy of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Appl. Microbiol.* 10, 231–236.
- Fraiese, A.P., Maillard, J.-Y., Sattar, S.A. (Eds.), 2013. Russell, Hugo & Ayliffe's. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Furukawa, S., Watanabe, T., Tai, T., Hirata, J., Narisawa, N., Kawarai, T., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2004. Effect of high pressure gaseous carbon dioxide on the germination of bacterial spores. *Int. J. Food Microbiol.* 91, 209–213.
- Furukawa, S., Watanabe, T., Koyama, T., Hirata, J., Narisawa, N., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2006. Effect of high pressure carbon dioxide on the clumping of the bacterial spores. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 95–98.
- Furukawa, S., Watanabe, T., Koyama, T., Hirata, J., Narisawa, N., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2009. Inactivation of food poisoning bacteria and *Geobacillus stearothermophilus* spores by high pressure carbon dioxide treatment. *Food Control* 20, 53–58.
- Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A.H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J.F., Devlieghere, F., 2007. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 1–28.
- Haas, G.J., Prescott, H.E., Dudley, E., Dik, R., Hintlian, C., Keane, L., 1989. Inactivation Of Microorganisms By Carbon Dioxide Under Pressure. *J. Food Saf.* 9, 253–265.

- Howell, J., Niu, F., McCabe, S.E., Zhou, W., Decedue, C.J., 2012. Solvent Removal and Spore Inactivation Directly in Dispensing Vials with Supercritical Carbon Dioxide and Sterilant. *AAPS PharmSciTech* 13, 582–589.
- Ishikawa, H., Shimoda, M., Tamaya, K., Yonekura, A., Kawano, T., Osajima, Y., 1997. Inactivation of *Bacillus* Spores by the Supercritical Carbon Dioxide Micro-bubble Method. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 1022–1023.
- Kamihira, M., Taniguchi, M., Kobayashi, T., 1987. Sterilization of microorganisms with supercritical carbon dioxide. *Agric. Biol. Chem.* 51, 407–412.
- Karajanagi, S.S., Yoganathan, R., Mammucari, R., Park, H., Cox, J., Zeitels, S.M., Langer, R., Foster, N.R., 2011. Application of a dense gas technique for sterilizing soft biomaterials. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 1716–1725.
- Levinson, H.S., Hyatt, M.T., 1970. Effects of temperature on activation, germination, and outgrowth of *Bacillus megaterium* spores. *J. Bacteriol.* 101, 58–64.
- McDonnell, G.E., 2007. Antisepsis, Disinfection, and Sterilization. *American Society of Microbiology*.
- Norton, T., Sun, D.-W., 2008. Recent Advances in the Use of High Pressure as an Effective Processing Technique in the Food Industry. *Food Bioprocess Technol.* 1, 2–34.
- Oyelade, O.J., Tunde-Akintunde, T.Y., Igbeka, J.C., Oke, M.O., Raji, O.Y., 2008. Modelling moisture sorption isotherms for maize flour. *J. Stored Prod. Res.* 44, 179–185.

- Pallado, P. Dry cleaning with liquid carbon dioxide, in: A. Bertucco, G. Vetter (Eds.), High Pressure Process Technology, Elsevier, 2001, pp. 641-649
- Qiu, Q.-Q., Leamy, P., Brittingham, J., Pomerleau, J., Kabaria, N., Connor, J., 2009. Inactivation of bacterial spores and viruses in biological material using supercritical carbon dioxide with sterilant. J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. 91B, 572–578.
- Russel, A.D., Hugo, W.B., Avliffe, G.A.J., 1999. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Blackwell Science.
- Schmidt, A., Beermann, K., Bach, E., Schollmeyer, E., 2005. Disinfection of textile materials contaminated with E. coli in liquid carbon dioxide. J. Clean. Prod. 13, 881–885.
- Setlow, B., Korza, G., Blatt, K.M.S., Fey, J.P., Setlow, P., 2016. Mechanism of Bacillus subtilis spore inactivation by and resistance to supercritical CO<sub>2</sub> plus peracetic acid. J. Appl. Microbiol. 120, 57–69.
- Shieh, E., Paszczynski, A., Wai, C.M., Lang, Q., Crawford, R.L., 2009. Sterilization of Bacillus pumilus spores using supercritical fluid carbon dioxide containing various modifier solutions. J. Microbiol. Methods 76, 247–252.
- Spilimbergo, S., Bertucco, A., Lauro, F.M., Bertoloni, G., 2003. Inactivation of Bacillus subtilis spores by supercritical CO<sub>2</sub> treatment. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 4, 161–165.

- Taniguchi, M., Suzuki, H., Sato, M., Kobayashi, T., 1987. Sterilization of plasma powder by treatment with supercritical carbon dioxide. *Agric. Biol. Chem.* 51, 3425–3426.
- Tarafa, P.J., Jiménez, A., Zhang, J., Matthews, M.A., 2010. Compressed carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) for decontamination of biomaterials and tissue scaffolds. *J. Supercrit. Fluids* 53, 192–199.
- Tersus Solutions. 2017. Recuperado de: <http://www.tersussolutions.com>, (Fecha de consulta: 20/02/2017).
- Van Roosmalen, M.J.E., Woerlee, G.F., Witkamp, G.J., 2004. Surfactants for particulate soil removal in dry-cleaning with high-pressure carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 30, 97–109.
- Van Roosmalen, M.J.E., Woerlee, G.F., Witkamp, G.J., 2003. Dry-cleaning with high-pressure carbon dioxide—the influence of process conditions and various co-solvents (alcohols) on cleaning-results. *J. Supercrit. Fluids* 27, 337–344.
- Wahl, C., Matthews, M.A., Price, R., An, Y., Jablonka, E., 2005. Dense carbon dioxide for medical cleaning applications: removing *S. aureus* from Ti-based surfaces. J.F. Brennecke, R.G. Carbonell, K.P. Johnston. (eds.), *Proc. 7th Int. Symp. Supercrit. Fluids* 128.
- Watanabe, T., Furukawa, S., Hirata, J., Koyama, T., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2003. Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores by high-pressure carbon dioxide treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7124–9.

- Watanabe, T., Furukawa, S., Tai, T., Hirata, J., Narisawa, N., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2003. High Pressure Carbon Dioxide Decreases the Heat Tolerance of the Bacterial Spores. *Food Sci. Technol. Res.* 9, 342–344.
- White, A., Burns, D., Christensen, T.W., 2006. Effective terminal sterilization using supercritical carbon dioxide. *J. Biotechnol.* 123, 504–515.
- Wiebe, R., Gaddy, V.L., 1939. The Solubility in Water of Carbon Dioxide at 50, 75 and 100°, at Pressures to 700 Atmospheres. *J. Am. Chem. Soc.* 61, 315–318.
- Zhang, J., Dalal, N., Matthews, M.A., Waller, L.N., Saunders, C., Fox, K.F., Fox, A., 2007. Supercritical carbon dioxide and hydrogen peroxide cause mild changes in spore structures associated with high killing rate of *Bacillus anthracis*. *J. Microbiol. Methods* 70, 442–451.
- Zhang, J., Davis, T.A., Matthews, M.A., Drews, M.J., LaBerge, M., An, Y.H., 2006. Sterilization using high-pressure carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 38, 354–372.
- Detección e identificación de agentes de guerra biológica. Estado del arte y tendencia futura., 2010. . Monogr. del SOPT. Minist. Defensa.





## **6. CONCLUSIONES**





En esta tesis se estudió la eficacia del CO<sub>2</sub> a alta presión (COAP) en la inactivación de tres tipos de esporas de *bacillus* que son biocontaminantes habituales y muy resistentes a los tratamientos de esterilización convencionales. El CO<sub>2</sub> está disponible y tiene bajo coste. Se trata de un disolvente “verde” que se encuentra en la atmósfera, en alimentos y bebidas de forma natural y del cual no necesita fijarse ningún contenido mínimo en los productos tratados (disolvente GRAS), por lo que se puede emplear con toda seguridad.

En términos generales y de la experiencia obtenida en los tres tipos de esporas, se puede concluir que el COAP efectivamente permite su eliminación. El tratamiento no requiere el uso ni de temperaturas ni de presiones elevadas. Así, el CO<sub>2</sub> debe aplicarse a 40°C si se usa en productos con elevada actividad de agua o se mezcla con aditivos, y a 65-80°C, en productos deshidratados, utilizando siempre presiones moderadas ( $\leq 100$  bar), es decir, a condiciones mucho más suaves que la esterilización con vapor de agua (120-160 °C) o la alta presión hidrostática ( $> 5000$  bar), respectivamente. Esto es importante para minimizar los costes de operación y de instalación.

Para un efecto esporicida del COAP per sé, separado del que causa la temperatura, es necesaria la presencia de un poco de agua, según se demostró en pimentón (capítulos 3 y 4) y en material militar (capítulo 5). Por lo tanto, en productos sólidos, cuanto mayor es la humedad inicial, menor es la temperatura para conseguir la esterilización. La cantidad de agua mínima oscila entre el 20-30% de fracción en masa respecto del material a tratar. Ello es debido a que junto a un calentamiento moderado favorece la germinación de las esporas haciéndolas más sensibles a la acción del CO<sub>2</sub>. También contribuye a la disolución del CO<sub>2</sub> causando una reducción del pH en el entorno, que es

un factor sinérgico para conseguir la esterilización a condiciones menos agresivas, como se ha probado en *B. cereus* y en *B. thuringiensis*, probablemente porque un medio ácido dificulta el crecimiento y la germinación de las esporas. El agua puede añadirse al principio de la operación, mojando el producto, como se realizó en pimentón, o añadirse en pequeñas cantidades disuelto o arrastrado por el CO<sub>2</sub>, para no causar un impacto negativo en materiales que no pueden mojarse, como ocurrió en los tejidos técnicos o en los dispositivos electrónicos utilizados en el capítulo 5.

En caso de esporas especialmente resistentes, como las que se encontraron en la flora natural microbiana del pimentón, o para el propio ántrax, el uso de aditivos es imprescindible para alcanzar la esterilización a bajas temperaturas. Mientras que en la literatura los aditivos propuestos fueron modificadores como el etanol o clásicos esporicidas, como el peróxido de hidrógeno o el ácido peracético, en este trabajo se propusieron alternativas menos tóxicas, para posible uso alimentario o en fármacos, como los aceites esenciales o ácidos orgánicos (cítrico). Según nuestro conocimiento era la primera vez que se proponía y publicaba la acción combinada de CO<sub>2</sub> y aceites esenciales, o de CO<sub>2</sub> modificado con agua acidificada con ácidos orgánicos (WO2016083653).

Es cierto que la dosis requerida de aceite esencial es elevada (2-3 % en fracción en masa respecto del material) y tiene un fuerte impacto organoléptico, pero también es fácilmente eliminable por el propio CO<sub>2</sub> total o parcialmente, según los requisitos finales, dado que hay productos en que el efecto sensorial de pequeñas cantidades de un aceite esencial es adecuado y previene futuras contaminaciones microbianas durante el envasado, el transporte o el almacenamiento.

La eficacia de los ácidos orgánicos mezclados con agua tiene que ver sobre todo con la acidez que se identificó en este trabajo como necesaria para conseguir la esterilización de esporas, del orden de 3,3-3,4. Es una acción distinta al peróxido de hidrógeno o el ácido peracético que la literatura atribuye a su fuerte poder oxidante. Mientras que estos oxidantes generan preocupación por las pequeñas cantidades residuales en el producto, no ocurriría lo mismo en el caso del agua ácida, porque el ácido propuesto no es tóxico, es el ácido natural del limón. En este caso, la principal preocupación sería, por un lado la presencia del agua y por el otro, el entorno ácido. Como se ha indicado anteriormente, el agua podría introducirse en pequeñas cantidades y/o se podría eliminar pasando CO<sub>2</sub> extra para solubilizar el sobrante y ajustar la humedad final del producto a niveles adecuados para almacenamiento, de la manera que se probó en pimentón. En cuanto a la acidez, una opción alternativa podría ser el uso de agua mezclado con isopropanol (capítulo 5), que rebaja menos el pH del medio a 4,7. Esta opción sería apropiada en tejidos (ya se utiliza isopropanol como aditivo en limpieza en seco para eliminar manchas polares) o en materiales sensibles a medios ácidos.

Para reducir el tiempo de tratamiento, se requiere un buen contacto entre el CO<sub>2</sub> y la materia prima a descontaminar. En sustratos líquidos, la operación en continuo fomentando una buena mezcla y dispersión, por ejemplo inyectando el CO<sub>2</sub> en microburbujas, sería el objetivo a conseguir en un escalado para comercialización. Esta medida contribuiría a reducir enormemente los tiempos de contacto previsiblemente a pocos minutos, como se demostró en este trabajo en la inactivación de las esporas de *Bacillus cereus* (capítulo 3) y de *Bacillus thuringiensis* (capítulo 5). También contribuiría a reducir la temperaturas necesaria para lograr la desactivación de organismos esporulados. Este hecho es de gran relevancia para la viabilidad del

proceso ya que permitiría tratamientos mucho más suaves y respetuosos con la calidad del producto.

En el caso de productos sólidos en polvo, la operación habría que llevarla a cabo como se opera hoy en extracción supercrítica, es decir, disponiendo el material a tratar en un lecho fijo y utilizando varios lechos en operación cíclica, unos en tratamiento y otros en descarga para simular una operación continua. El  $\text{CO}_2$  habría que recircularlo para reducir el consumo de materias primas, pero habría que hacerlo a gran velocidad, como se demostró en este trabajo tanto en el tratamiento de la crema de manzana (capítulo 2), como en el material militar (capítulo 5), para favorecer la turbulencia y el buen contacto del  $\text{CO}_2$ , evitando zonas muertas y canales preferentes. En tejidos quizá se podría utilizar un tambor rotatorio como se hace hoy en la limpieza en seco o en el desengrasado de pieles con  $\text{CO}_2$ . Operando así, con adecuado contacto entre los materiales y el  $\text{CO}_2$ , los tiempos de esterilización pueden ser relativamente cortos, del orden de 15-30 minutos, dependiendo de la materia prima y del tipo de espora.

En cualquier caso, tanto para líquidos como para sólidos, hay madurez tecnológica y equipos comerciales desarrollados desde hace décadas para extracción, desengrasado y la limpieza en seco con  $\text{CO}_2$  que servirían para la esterilización. Por lo que cualquier aplicación exitosa demostrada a escala laboratorio se podría llevar a comercialización enseguida. Las instalaciones de tratamiento podrían diseñarse para gran escala con el objetivo de limpiar y esterilizar regularmente o como unidades móviles.

## RECOMENDACIONES DE TRABAJO FUTURO

La esterilización con COAP se debe estudiar en un mayor abanico de aplicaciones dentro de la industria alimentaria, farmacéutica y biomédica. También tiene posibilidades en la industria de los dispositivos optoelectónicos, quirúrgicos y en general, de ámbito hospitalario. De esta forma, se podría elaborar un catálogo de productos donde la esterilización con COAP fuese la más adecuada y tuviese su nicho de especialización.

Aunque los ensayos de esta tesis se hicieron sobre esporas, el tratamiento es seguramente efectivo para la desactivación de otros microorganismos, tales como virus así como enzimas causantes del deterioro de productos sensibles, dado que la bibliografía demuestra ampliamente que para formas vegetativas y enzimas, las condiciones de esterilización con COAP son mucho menos agresivas. Ello abre oportunidades en la esterilización de productos con distintos microorganismos y/o con enzimas causantes de efectos indeseables. Como el CO<sub>2</sub> es GRAS, los productos tratados con CO<sub>2</sub> se podrían comercializar como productos libres de disolventes y es aplicable a productos ácidos. No obstante, habría que revisar la normativa de nuevos productos y/o procesos así como la de etiquetado de los productos. También habría que revisar la protección intelectual del procedimiento en cada caso, puesto que hay muchas patentes, especialmente en productos líquidos.

Es necesario avanzar en el mecanismo de inactivación de esporas mediante COAP. Aunque hay reciente bibliografía en el asunto, falta determinar las cinéticas de inactivación para poder diseñar adecuadamente los procesos y las instalaciones donde

llevar a cabo el tratamiento. Para probar la viabilidad de la tecnología también faltan estudios económicos rigurosos.

Una posibilidad muy interesante de que el agente de esterilización sea el CO<sub>2</sub>, es que es posible combinar la esterilización con la extracción. Para ello, hay que optimizar bien las condiciones de operación. Para la esterilización no es necesaria una elevada presión, pero para la extracción, seguramente sí. En principio, la extracción de compuestos volátiles o grasas es un efecto indeseado en la esterilización con COAP. No se observó ningún problema en los productos ensayados en esta tesis, tan sólo en pimentón a altas presiones se observó extracción de oleorresina. Por el contrario, puede convertirse en una ventaja. Un ejemplo realizado en nuestro grupo fue el desengrasado de cacao a la vez que su esterilización (WO2008000846 A1). Otro ejemplo, es la esterilización de equipamiento técnico a la vez que su limpieza. También está descrita la eliminación de lípidos de huesos a la vez que su esterilización, etc.







## **CURRICULUM VITAE**

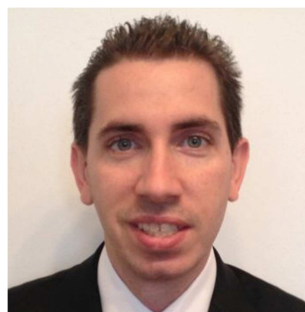


## **Información Personal.**

Nombre: Javier Casas Huertas

Fecha de nacimiento: 17 de Enero de 1983

Lugar de nacimiento: Madrid (España)



## **Estudios.**

Máster en Alimentación y Salud. Posgrado Oficial en Tecnología de los Alimentos,  
Nutrición y Bromatología. (2.007 - 2.008)

Universidad de Murcia.

Licenciado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. (2.004 - 2.006)

Universidad Autónoma de Madrid.

Diplomado en Nutrición Humana y Dietética. (2.001 - 2.004)

Universidad Autónoma de Madrid.

## **Experiencia profesional.**

Técnico de Desarrollo de producto e I+D (2014 - actualidad)

Laboratorios Ynsadiet.

Técnico Test intolerancias alimentarias (2013-2014)

Laboratorios Ynsadiet.

Investigador doctorando (2010 – 2013)

Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid

Dietista (2009- 2.010)

Cuida tu línea (Arkochim)

Dietista (2008- 2009)

Natur House

Analista microbiológicos de alimentos (2007-2008)

Universidad de Murcia

## Resultados científicos derivados de esta tesis.

- Casas, J., Calvo, L., 2017. Destruction of bioweapons in sensitive materials by CO<sub>2</sub> and water, enviado a publicación.
- Casas, J., Tello, J., Gatto, F., & Calvo, L., 2016. Microbial inactivation of paprika using oregano essential oil combined with high-pressure CO<sub>2</sub>. *The Journal of Supercritical Fluids*, 116, 57–61.
- Calvo, L., Casas, J., 2016. Method for sterilisation using CO<sub>2</sub> and water. WO2016083653.
- Casas, J., Valverde, M. T., Marín-Iniesta, F., & Calvo, L., 2012. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high pressure CO<sub>2</sub> in apple cream. *International Journal of Food Microbiology*, 156(1), 18–24.

## Comunicaciones a congresos derivados de esta tesis:

- Casas, J. y Calvo L., 2017. Sterilization of sensitive military material by high pressure carbon dioxide. 16<sup>th</sup> European Meeting on Supercritical Fluids. Lisboa, Portugal, 25-28 abril.
- Casas, J. y Calvo L., 2013. Inactivation of spores by high pressure CO<sub>2</sub>. 6th International Symposium on High Pressure Process Technology. Belgrado, Serbia 8-11 Septiembre.
- Casas, J. y Calvo L., 2012. Desactivación de esporas mediante CO<sub>2</sub> supercrítico  
Congreso: VI Reunión de expertos en tecnologías de fluidos comprimidos, FLUCOMP. Madrid, España 28-29 Junio.
- Casas, J., Valverde, M.T., Marín-Iniesta, F. y Calvo, L., 2011. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high pressure CO<sub>2</sub> in apple cream. 13th European Meeting on Supercritical Fluids. La Haya, Países Bajos 9-12 octubre
- Casas, J., Valverde, M.T., Marín-Iniesta, F. y Calvo, L., 2011. Desactivación de esporas de *A. acidoterrestris* en crema de manzana con CO<sub>2</sub> a alta presión. VI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los alimentos. Valencia, España 8-10 junio

## Otros resultados científicos.

- García-Alonso, F. J., Bravo, S., Casas, J., Pérez-Conesa, D. Jacob, K. & Periago, M.J., 2009. Changes in Antioxidant Compounds during the Shelf Life of Commercial Tomato Juices in Different Packaging Materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (15), 6815-6822.
- Viguera, M., Marti, A., Prieto, C., Martín, A., Casas, J. y Calvo L., 2014. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of the lipids produced by microalgae *Chlorella protothecoides* under heterotrophic growth. 10th International Conference on Renewable Resources & Biorefineries. Valladolid, España 4 - 6 Junio.
- Martín, A., Marti, A., Viguera, M., Casas, J., Prieto, C. y Calvo L., 2014. Heterotrophic growth of microalgae *Chlorella protothecoides* for lipid production using wastes. 10th International Conference on Renewable Resources & Biorefineries. Valladolid, España 4 – 6 Junio.